

明 細 書

核酸分離精製カートリッジおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸を分離するための核酸分離精製カートリッジに関する。より詳細には、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、第1開口側から第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジ、および、インサート射出成形により製造される核酸分離精製カートリッジおよびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 核酸は、様々な分野において種々の形態で使用されているが、多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、単離および精製操作が煩雑で時間を要する。

[0003] この核酸を簡便かつ効率的に分離精製する方法として、少なくとも2個の開口を有する容器内に、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いた方法が、特開2003-128691号公報(以下、「特許文献1」という場合がある。)に記載されている(図19参照)。この方法は、まず、核酸を含む試料溶液中に、前記核酸分離精製ユニットの一の開口Zを入没させる。次いで、他の一の開口Yに接続された圧力差発生装置を用いて、前記核酸分離精製ユニットの内部を減圧状態にして、試料溶液を容器内に吸入する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中に存在する核酸が固相に吸着する。続いて、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した試料溶液を排出する。

[0004] 次に、前記と同様の減圧-加圧操作で洗浄液を容器内に吸入した後、容器から排出して容器内を洗浄する。この洗浄液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。更に、固相に吸着した核酸を離脱させるための回収液を、上記と同様の減圧-加圧操作によって容器内に吸入し、容器から排出する。この排出された回収液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収することにより分離精製が完了する。

[0005] ここで、核酸を吸着させる固相としては、核酸吸着性多孔性膜が一般的に用いられている。

また、このような核酸分離精製ユニット(核酸分離精製カートリッジ)の構造としては、当該ユニットの容器を構成する2つの筒状の部品により核酸吸着性多孔性膜を挟みつけて保持する構造が一般的である。そして、この2つの筒状の部品の固着方法としては、超音波溶着、レーザーによる熱溶着、接着剤、ネジなどによって固着する方法が用いられている。

発明の開示

[0006] しかしながら、容器を構成する2つの筒状の部品を射出成形により製造し、一方の筒状の部品の内部に核酸吸着性多孔性膜を挿入し、組み立て加工機で2つの筒状の部品を組み合わせて核酸分離精製ユニットを製造する場合は、2つの筒状の部品を組み合わせた後に、超音波溶着やレーザーによる熱溶着等を行って筒状の部品同士を固着する必要がある。そのため、2つの筒状の部品を固着するための専用設備(例えば超音波溶着機等)が必要となる。

[0007] また、核酸分離精製ユニットは、試料溶液を加圧して核酸吸着性多孔性膜を通過させることから、核酸吸着性多孔性膜の側面(容器と核酸吸着性多孔性膜の接触部)からの試料溶液の回り込みを防止するために、容器を構成する2つの部品によって核酸吸着性多孔性膜の周縁部をしっかりと押さえつけて挟持する必要がある。

しかしながら、多数個の筒状の部品を同時に押し付けて核酸吸着性多孔性膜を挟持させて多数個の核酸分離精製カートリッジを同時に製造すると、製造誤差により部品の高さにばらつきがあることから、核酸吸着性多孔性膜を押し潰す力に差が生じ、押し潰す力が足りない場合にはシール不良となる。一方、押し潰す力が強すぎる場合には核酸吸着性多孔性膜が破れてしまうおそれがある。そのため、この方法では、同時に多数個の核酸分離精製カートリッジを製造することが困難と考えられる。

[0008] また、前記の核酸分離精製カートリッジでは、洗浄液にて洗い流す際、出来るだけ容器内に洗浄液が残留しないのが望ましい。洗浄液が残留した状態で、回収液にて核酸を回収すると、排出された回収液に洗浄液が混入し、この混入した洗浄液の濃度によっては、次工程、例えば、PCR(Polymerase Chain Reaction)等におい

て、悪影響を及ぼすおそれがある。

[0009] さらに、前記の核酸分離精製カートリッジでは、核酸分離精製カートリッジ内の溶液等を排出し終わった後も加圧装置により継続して空気を圧送することとなる。このとき、核酸を分離精製するための膜は多孔性であるためにこの溶液等が膜を通過した際に細かい泡を生じることがある。かかる現象は粘性の高い試料溶液において特に生じ易い。そして、生じた細かい泡は加圧された空気によって、溶液等を排出するための他の開口まで運ばれ、排出部402の開口近傍に溜まる(図20参照)。さらに、この開口から吹き出したエアは、当該カートリッジの下部に配置されている廃液容器400の内部で巻き上がり、巻き上がったエアによってこの泡が排出部の外壁面にまで回り込み、付着する。

[0010] 付着した泡は、その後の回収液による回収工程で精製された核酸と共に回収されてしまう。このようにして回収された泡は未洗浄の溶液であるので、回収液によって回収された核酸に対しては不純物となる。すなわち、核酸の精製率を悪化させるという問題や、後工程において回収された核酸を使用して実験・研究する際に、酵素反応を阻害する虞がある。

[0011] 本発明は、これらの問題を解決するためになされたものであり、容器を固着するための専用設備が不要であり、多数個を同時に製造することができる核酸分離精製カートリッジおよびその製造方法を提供することを第一の課題とする。

[0012] また、本発明は、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、第1開口側から第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジを用いて核酸の分離精製を行う際に、洗浄工程において、洗浄液が容器内に残留し難い(洗浄液が排出され易い)核酸分離精製カートリッジを提供することを第二の課題とする。

[0013] さらに、本発明は、排出部の外壁面に溶液等が付着しない構成とした核酸分離精製カートリッジを提供することを第三の課題とする。

[0014] これらの課題を解決するため、本発明に係る核酸分離精製カートリッジは、有底筒状の筒状本体の底部に開口を有し、前記底部に核酸吸着性多孔性膜を支持した核

酸分離精製カートリッジであって、前記核酸吸着性多孔性膜は、その周縁部が前記筒状本体の筒部を形成する成形材料により挟持され、前記核酸吸着性多孔性膜を挟持する一方の部分である前記底部を形成する底部材に前記核酸吸着性多孔性膜を配置した上でこれらを射出成形型のキャビティ内にインサートし、さらにこのキャビティ内に成形材料を射出することで、前記核酸吸着性多孔性膜を挟持する他方の部分である前記筒状本体の筒部を形成する部分が前記底部材と一体化されて成形されると同時に前記核酸吸着性多孔性膜を挟持したことを特徴とする。

[0015] 本発明に係る核酸分離精製カートリッジによれば、核酸吸着性多孔性膜を挟持する一方の部分である底部を形成する底部材に核酸吸着性多孔性膜を配置した上でこれらを射出成形型のキャビティ内にインサートし、さらにこのキャビティ内に成形材料を射出することで、核酸吸着性多孔性膜を挟持する他方の部分である前記筒状本体の筒部を形成する部分が前記底部材と一体化されて成形されると同時に核酸吸着性多孔性膜を挟持することから、従来必要とされていた超音波溶着機等の固着のための専用設備が不要となり、射出成形装置のみで核酸分離精製カートリッジを製造することが可能となる。また、部品の製造誤差による核酸吸着性多孔性膜の押圧力の差によって核酸吸着性多孔性膜が破れたりシール不足となったりすることがない。

[0016] また、前記底部材は、前記底部の開口に連通する筒状の排出部（ノズル）をさらに備えていることが好ましい。これにより、核酸吸着性多孔性膜を通過した液体が飛び散ることなく排出部の先端から流下する。

[0017] また、前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、前記筒状本体の筒部を形成する成形材料の射出圧力により押し潰されて挟持されていることが好ましい。これにより、核酸吸着性多孔性膜の周縁部の内部に無数に存在する空隙（孔）が潰されることとなり、当該周縁部に試料溶液や洗浄液が残留することがなく、また、核酸吸着性多孔性膜の側面へ試料溶液が回り込むことがない。

[0018] また、前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、内部の空隙がなくなるまで押し潰されていることが好ましい。これにより、試料溶液等の残留や回り込みを確実に防止することができる。

- [0019] また、前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰されていることが好ましい。これにより、核酸吸着性多孔性膜の周縁部の内部に無数に存在する空隙(孔)が押し潰されてなくなることから、試料溶液等の残留や回り込みを確実に防止することができる。
- [0020] また、前記核酸分離精製カートリッジが複数個つながった状態で同時に成形される核酸分離精製カートリッジ群においては、前記射出成形型は前記キャビティを複数個備えており、前記複数個のキャビティ内には前記底部材に前記核酸吸着性多孔性膜が配置された上でこれらがそれぞれインサートされ、さらに前記複数個のキャビティは互いに連通していることが好ましい。
- [0021] かかる核酸分離精製カートリッジ群によれば、前記射出成形型は前記キャビティを複数個備えており、前記複数個のキャビティ内には前記底部材に前記核酸吸着性多孔性膜が配置された上でこれらがそれぞれインサートされ、さらに前記複数個のキャビティは互いに連通していることから、同じ射出圧力で射出される樹脂がそれぞれのキャビティに充填されることとなるため、核酸吸着性多孔性膜を押圧する力が等しくなり、シール不足や破れが発生することなく、同時に多数の核酸分離精製カートリッジを、或いは、多数の核酸分離精製カートリッジが連結された核酸分離精製カートリッジ群を、製造することができる。
- [0022] ここで、「つながった状態」とは、カートリッジ同士が直接つながった状態であってもよいし、ランナーによってつながっている状態でもよい。これにより、複数の核酸分離精製カートリッジを同時に製造することが可能となるため、製造効率を飛躍的に向上させることができる。
- [0023] 本発明に係る核酸分離精製カートリッジの製造方法は、有底筒状の筒状本体の底部に開口を有し、前記底部に核酸吸着性多孔性膜を支持した核酸分離精製カートリッジの製造方法であって、前記筒状本体の底部を有して前記筒状本体の一部を形成する底部材の底部に、前記核酸吸着性多孔性膜を配置した状態で、前記底部材および前記核酸吸着性多孔性膜を射出成形型のキャビティ内に配置する工程と、前記核酸吸着性多孔性膜にコアピンを押し当て、前記コアピンの周囲に前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部がはみ出した状態で前記核酸吸着性多孔性膜を保持する工

程と、前記射出成形型を閉じる工程と、前記キャビティ内に成形材料を射出し、前記筒状本体の筒部を成形すると同時に前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を成形材料と前記底部とで挟持する工程と、前記射出成形型から成形体を取り出す工程と、を有することを特徴とする。

[0024] 本発明に係る核酸分離精製カートリッジの製造方法によれば、筒状本体の底部を有して筒状本体の一部を形成する底部材の底部に、核酸吸着性多孔性膜を配置した状態で、底部材および核酸吸着性多孔性膜を射出成形型のキャビティ内に配置する工程と、核酸吸着性多孔性膜にコアピンを押し当て、コアピンの周囲に核酸吸着性多孔性膜の周縁部がはみ出した状態で核酸吸着性多孔性膜を保持する工程と、射出成形型を閉じる工程と、キャビティ内に成形材料を射出し、筒状本体の筒部を成形すると同時に核酸吸着性多孔性膜の周縁部を成形材料と底部とで挟持する工程と、射出成形型から成形体を取り出す工程と、を有することから、超音波溶着機等を用いて筒状の部品同士を固着する工程が不要となり、射出成形装置のみで核酸分離精製カートリッジを製造することが可能となる。また、部品の製造誤差(寸法誤差)による核酸吸着性多孔性膜の押圧力の差によって核酸吸着性多孔性膜が破れたりシール不足となったりすることがない。

[0025] また、前記核酸分離精製カートリッジの製造方法においては、前記コアピンは、前記核酸吸着性多孔性膜を、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰して保持することが好ましい。これにより、成形材料の注入圧によって核酸吸着性多孔性膜がずれたりしわがよったりすることがない。

[0026] また、前記核酸分離精製カートリッジの製造方法においては、前記コアピンの先端部は、その周縁部から中心部に向かって円錐形状に形成されていることが好ましい。これにより、コアピンは自律的に調心される。

[0027] また、前記核酸分離精製カートリッジの製造方法においては、前記コアピンの周囲にはみ出した前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を、前記キャビティ内に射出された成形材料の射出圧力により、内部の空隙がなくなるまで押し潰すことが好ましい。これにより、試料溶液等の残留や回り込みを確実に防止することができる。

[0028] また、前記核酸分離精製カートリッジの製造方法においては、前記コアピンの周囲

にはみ出した前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を、前記キャビティ内に射出された成形材料の射出圧力により、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰すことが好ましい。これにより、核酸吸着性多孔性膜の周縁部の内部に無数に存在する空隙(孔)が押し潰されてなくなることから、試料溶液等の残留や回り込みを確実に防止することができる。

[0029] また、前記核酸分離精製カートリッジの製造方法により多数の核酸分離精製カートリッジを同時に製造する方法においては、前記射出成型型は前記キャビティを複数個備えており、前記複数個のキャビティ内には前記底部材に前記核酸吸着性多孔性膜が配置された上でこれらがそれぞれインサートされ、さらに前記複数個のキャビティは互いに連通していることが好ましい。

[0030] このような、多数の核酸分離精製カートリッジを同時に製造する方法によれば、射出成型型はキャビティを複数個備えており、複数個のキャビティ内には底部材に核酸吸着性多孔性膜が配置された上でこれらがそれぞれインサートされ、さらに複数個のキャビティは互いに連通していることから、同じ射出圧力で射出される樹脂がそれぞれのキャビティに充填されることとなるため、核酸吸着性多孔性膜を押圧する力が等しくなり、シール不足や破れが発生することなく、同時に多数の核酸分離精製カートリッジを、或いは、多数の核酸分離精製カートリッジが連結された核酸分離精製カートリッジ群を、製造することができる。

[0031] 本発明に係る核酸分離精製カートリッジは、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、前記底部は、底面と、前記底面に形成された複数の突起とを有し、前記複数の突起は、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されていることを特徴とする。

- [0032] 本発明の核酸分離精製カートリッジによれば、底面に設けられた複数の突起が、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近付くほど前記排出部の方へ変位するように形成されているため、洗浄工程において、洗浄液を加圧ガスにより通流させる際、核酸吸着性多孔性膜が突起に沿って、排出部側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液が筒状本体の底部に残留することなく、速やかに排出部から排出される。
- [0033] また、前記複数の突起は、好ましくは前記底部開口から放射状に延びる複数のリブである。この場合、前記リブは3本以上であることが好ましい。なお、前記筒状体の径方向に対するそれぞれの前記リブの傾斜角度は、好ましくは 3° 以上、より好ましくは 5° 以上である。
- [0034] また、前記底面は、前記底部開口に近付くほど前記排出部の方へ変位する傾斜を有することが好ましい。これにより、洗浄液がより速やかに排出される。また、前記筒状体の径方向に対する前記底面の傾斜角度は、好ましくは 10° 以上、より好ましくは 15° 以上、最も好ましくは 20° 以上である。
- [0035] また、前記リブは、頂部が円弧状に形成されているのが好ましい。これにより、リブの頂部と核酸吸着性多孔性膜との間に洗浄液が滞留し難くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。また、前記核酸分離精製カートリッジは、内面に存在する角部および隅部が円弧状に形成されているのが好ましい。これにより、内面に存在する角部および隅部に、洗浄液が滞留し難くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。なお、リブの頂部の曲率半径はリブ幅に対して $1/4$ 以上が好ましく、より好ましくは $1/3$ 以上、最も好ましくは $1/2$ 以上である。また、角部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.2mm 以上、最も好ましくは 0.3mm 以上である。また、隅部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.15mm 以上、最も好ましくは 0.2mm 以上である。
- [0036] また、前記筒状体の軸と前記筒状体の内周面とがなす角度は、好ましくは 10° 以下、より好ましくは 5° 以下である。これにより、洗浄液が筒状体の内周面を伝って流れ易くなるので、洗浄液がより速やかに排出される。

[0037] また、前記核酸分離精製カートリッジの内壁面には、前記洗浄液の液滴の接触角が 80° 以下または 90° 以上となるような材質、あるいはそのような接触角となるように表面処理が行われた材質を用いるのが好ましい。接触角が 80° 以下の場合には、核酸分離精製カートリッジの内壁面に対する洗浄液の濡れ性が向上し、洗浄液が液滴として残留し難くなるため、洗浄液がより速やかに排出される。なお、濡れ性を更に向上させるためには、接触角は 60° 以下がより好ましく、 50° 以下が最も好ましい。

また、接触角が 90° 以上の場合には、核酸分離精製カートリッジの内壁面に洗浄液が液滴として残留しても、その液滴は表面張力により略球状となるため、加圧ガスにより除去し易くなる。これにより、洗浄液がより速やかに排出される。

[0038] また、前記核酸吸着性多孔性膜は、その周縁部が潰れた状態で保持されるのが好ましい。核酸吸着性多孔性膜は孔部を有するため、その周縁部が潰れた状態で保持されると、孔部が塞がるようにして潰れるため、その部分からは液体が流れなくなる。これにより、核酸吸着性多孔性膜を通るべき液体(試料溶液等)が、核酸吸着性多孔性膜の側部に回り込む不具合を防ぐことができる。

[0039] 本発明に係る核酸分離精製カートリッジは、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、前記排出部の前記第2開口を形成する部分の肉厚は、0.2mm以上であることを特徴とする。

なお、前記第2開口を形成する部分の肉厚は、0.5mm以上であることがさらに好ましい。

[0040] 排出部の第2開口における肉厚がこのような厚みを有することにより、泡がエアで巻き上げられた場合であっても、排出部の外壁面まで泡が回り込むことがなく、外壁面への泡の付着を防止することができる核酸分離精製カートリッジを具現することができる。特に、排出部が筒状に形成されている場合に、この排出部の外壁面に泡が回り込むことを防止することができる。

[0041] 前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記第2開口の開口径が1.0mm以上であり、かつ、前記第2開口を形成する部分の肉厚が0.2mm以上であり、さらに、前記第2開口を形成する部分の外径が1.4mm以上であることが好ましい。

なお、前記第2開口を形成する部分の外径は、2.0mm以上であることがより好ましい。

[0042] このように第2開口の開口径と、第2開口を形成する部分の肉厚と、第2開口を形成する部分の外径とを規定したことにより、良好な排出性、排出部の外壁面への泡の付着防止性を具備した核酸分離精製カートリッジを具現することができる。

[0043] また、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記排出部の端面と、前記排出部の外壁面とのなす角度を、 105° 以下とするのが好ましい。なお、排出部の端面と外壁面とのなす角度を 100° 以下とするのがより好ましく、 95° 以下とするのがさらに好ましい。また、排出部の端面の形状を第2開口へ近づくにつれ開口径が広がる漏斗形状としてもよい。この場合、前記排出部の端面と外壁面のなす角度を、 30° 以上とするのがよい。

[0044] 排出部の端面と、排出部の外壁面とのなす角度をこのように形成したので、排出部の外壁面に試料溶液の泡が回り込み難い核酸分離精製カートリッジを具現することができる。また、外壁面に泡が付着した場合であっても、その泡は排出部の第2開口近傍に戻り易く、洗浄液によってこれを取り除くことが容易な核酸分離精製カートリッジを具現することができる。結果、回収液に未処理の試料溶液の混入を防止することができる核酸分離精製カートリッジを具現することができる。また、排出部の端面の形状を第2開口へ近づくにつれ開口径が広がる漏斗形状とすると、発生した泡が当該外壁面にまで回り込み難くなる。さらに、排出部の端面と外壁面とのなす角度を、 30° 以上に形成してもよく、このようにすると泡の回り込みを防止することができる。

[0045] さらに、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては端面および外壁面の樹脂親水性を高めるのが好ましい。すなわち、核酸分離精製カートリッジを構成する材質を濡れ易いものとするのが好ましい。

[0046] ここで、排出部の端面のみを考えた場合、撥水性を高めると溶液と端面との濡れ性が悪くなって溶液や泡をはじき易くなるので端面への泡の付着を防ぐことができ、ま

た、端面から外壁面へ泡を持ち上げる表面エネルギーも大きくなる結果、泡は外壁面に付着し難くなる。しかし、前記寸法以下でテストした際に、外壁面へ回りこんだ泡は、外壁面の撥水性により表面エネルギーが強く、重力で落下しなかった。また、洗浄液も撥水してしまい、泡を引き込むことができなかった。したがって、核酸分離精製カートリッジの端面および外壁面の樹脂親水性を高めることが好ましい。

なお、本発明において「濡れ性」とは溶液と対象物(端面や外壁面)とのなじみ易さをいい、溶液と対象物との接触角で規定される。実験から前記した寸法・形状において端面に泡を保持することができ、かつ、洗浄工程で不純物を洗い落とすための溶液(洗浄液)と対象物との接触角としては、 100° 以下がよく、好ましくは 95° 以下、より好ましくは 90° 以下である。

[0047] また、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記排出部の端面に、泡を誘導するための爪部材を設けるのがよい。この爪部材を1本から複数本設けるのが望ましい。また、この爪部材の内側の位置を排出部の内壁面と一致するように設けるのが特に望ましい。なお、この爪部材は棒状に形成するのがさらに好ましい。

[0048] このように構成することで、第2開口に到達した泡は、内壁面に延設された爪部材を伝ってその先端部分、すなわち、第2開口より下の位置で凝集する。その結果、凝集した泡は廃液容器に落ち易くなるので、泡が外壁面に付着し難くなる。また、エアによって泡が吹き上げられた場合であっても、これが外壁面まで到達することはない。

[0049] 以上のように、本発明に係る核酸分離精製カートリッジおよびその製造方法によれば、容器を固着するための専用設備が不要となり、また、多数個を同時に製造することが容易となる。したがって、製造設備費を大幅に削減することができるとともに、製造効率を飛躍的に増大させることができる。

[0050] また、本発明に係る核酸分離精製カートリッジによれば、洗浄工程において、洗浄液が核酸分離精製カートリッジの内部に残留せずに、速やかに排出されるので、排出された回収液への洗浄液の混入を抑えることができる。これにより、次工程において、洗浄液に起因する不具合を未然に防ぐことができる。

[0051] また、本発明に係る核酸分離精製カートリッジによれば、試料溶液の泡が、核酸分離精製カートリッジの排出部の外壁面に付着することを防止することができる。さらに

、未処理の試料溶液の泡の混入防止を図ることができるので、核酸の精製率を向上することが可能である。また、回収した核酸を使用した実験や研究において、酵素による反応が阻害されるなどの問題の発生を未然に防ぐことが可能である。

図面の簡単な説明

- [0052] [図1]第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図である。
- [図2]第1実施形態に用いるインサート材の拡大断面斜視図である。
- [図3]核酸分離精製カートリッジと射出成型型の断面図であり、(a)はインサート材設置時、(b)は型閉じ時の状態をそれぞれ示している。
- [図4]核酸分離精製カートリッジと射出成型型の断面図であり、(a)は樹脂注入時、(b)は注入完了時の状態をそれぞれ示している。
- [図5]図4(b)のA部を拡大して示した断面図であり、(a)は型閉じ時、(b)は型閉じ完了時、(c)は樹脂注入時、(d)は注入完了時の状態をそれぞれ示している。
- [図6]第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。
- [図7]第2実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ群の斜視図である。
- [図8]本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図である。
- [図9]本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。
- [図10]本発明の第3実施形態に用いられるキャップの拡大断面斜視図である。
- [図11]図10のX-X線断面図である。
- [図12]図9のB部における拡大図である。
- [図13]本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの洗浄工程を示す断面図である。
- [図14]本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図である。
- [図15]本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。
- [図16]本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面図である。
- [図17]本発明の第5実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面図である。
- [図18]本発明の第6実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面

図である。

[図19]核酸分離精製ユニットの縦断面図である。

[図20]加圧により溶液を排出する核酸分離精製カートリッジを示した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0053] [第1実施形態]

本発明の核酸分離精製カートリッジに係る第1実施形態について、適宜図面を参照しながら説明する。参照する図1は、第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図であり、図2は、第1実施形態に用いるインサート材の拡大断面斜視図である。

[0054] (核酸分離精製カートリッジの構造)

図1に示すように、本発明の第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ100は、底部材120と核酸吸着性多孔性膜Fとからなるインサート材110と、このインサート材110に対してインサート射出成形されるバレル140とから構成されている。

なお、第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ100のバレル140は、インサート射出成形により、底部材120および核酸吸着性多孔性膜Fと一体的に形成されるものであるが、図1においては、説明の便宜上、バレル140を分離して示している。

[0055] なお、図1に示すバレル140と、底部121と、底部側融着部123とから、「筒状本体」が構成される。また、バレル140が、「筒状本体の筒部を形成する部分」である。

[0056] (インサート材110)

インサート材110は、核酸分離精製カートリッジ100の底部側を構成する底部材120と、核酸を吸着して採取するための核酸吸着性多孔性膜Fとから構成される。インサート材110は、核酸分離精製カートリッジ100を成形するための射出成型型(底部側金型150およびバレル側金型160)に予めセットされ(図3参照)、キャビティ151に成形材料の一例である溶融した樹脂Jが注入されることにより、当該樹脂Jにより成形されるバレル140と融着される。

[0057] (底部材120)

底部材120は、中央に開口部121aが形成された底部121と、この底部121の下面から延出するノズル122(排出部)と、ノズル122とは反対側に向かって底部121の外

周に沿って筒状に延出する底部側融着部123とから構成されている。ノズル122の先端には第2開口122aが形成されており、底部121の開口部121aと連通している。底部側融着部123は、後記するバレル140のバレル側融着部142と融着する部分であり、その内径は、核酸吸着性多孔性膜Fの直径と略等しく形成されている。

[0058] 底部材120の底部121には、図2に示すように、底面121bの外周に沿って、底面121bよりも1段高くなった挟持面125が環状に形成されている。挟持面125は、後記する核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faと当接する面であり、平坦に形成されている。底面121bは、挟持面125側から開口部121a側に向かうほど低くなる(第2開口122a側に近づく)ように傾斜しており、試料溶液が排出され易くなっている。また、底面121bには、6本(図2においては3本のみ図示)のリブ126が放射状に形成されている。リブ126は、底面121bから突出しており、底面121bの傾斜角度よりゆるい角度で、挟持面125側から開口部121a側に向かうほど低くなるように傾斜している。

[0059] (核酸吸着性多孔性膜F)

核酸吸着性多孔性膜Fは、前記した底部側融着部123の内径と略同一の直径をした円形状の膜部材である。核酸吸着性多孔性膜Fは、無数の微細な孔を有しており、試料溶液を濾過して核酸を抽出できるようになっている。また、核酸吸着性多孔性膜Fは、前記した底部材120の挟持面125の上に載置されて、インサート材110を構成する(図2参照)。核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faは、挟持面125に当接する部分であり、後記するバレル140の射出成形時の注入圧により挟持面125に押し付けられて保持される。

[0060] (バレル140)

バレル140は、図1に示すように、円筒状のバレル本体部141と、バレル本体部141に連なる円筒状のバレル側融着部142とからなる。バレル140は、インサート材110を底部側金型150に設置した後(図3参照)、キャビティ151に樹脂Jを射出することにより成形される。バレル140の中空部143は、試料溶液等を一時的に貯留する部分であり、後記するバレル側金型160に備えられたコアピン161によって成形される(図4参照)。

また、図1に示すように、中空部143の上端は開口しており(第1開口143a)、中空

部143の下端は核酸吸着性多孔性膜Fによって塞がれることとなる。

バレル側融着部142は、コアピン161と底部材120の底部側融着部123との間に形成された隙間(図5(b)のキャビティ151a)に流入した樹脂Jにより成形される。そのため、実際には、当該隙間に流入した樹脂Jの熱によって底部側融着部123の内周面123a(図2参照)が溶融し、バレル140とインサート材110が一体化されることとなる。

[0061] (核酸分離精製カートリッジの製造方法)

続いて、第1実施形態における核酸分離精製カートリッジの製造方法について、図面を参照して説明する。参照する図面において、図3は、核酸分離精製カートリッジと射出成形型の断面図であり、(a)はインサート材設置時、(b)は型閉じ時の状態をそれぞれ示している。また、図4は、同じく核酸分離精製カートリッジと射出成形型の断面図であり、(a)は樹脂注入時、(b)は注入完了時の状態をそれぞれ示している。

[0062] なお、核酸分離精製カートリッジ100の製造には、公知の射出成形機を用いることができる。射出成形機は、射出成形型にインサート材110を設置する必要があることから、縦型射出成形機を用いるのが好ましいが、インサート材110(核酸吸着性多孔性膜F)を所定位置に保持することが可能であれば横型であってもよい。本実施形態においては、底部側金型150と、バレル側金型160とから、「射出成形型」が構成されている。

[0063] (インサート材110の設置)

はじめに、図3(a)に示すように、予め製造しておいた底部材120の底部121の挟持面125およびリブ126によって支持されるように、核酸吸着性多孔性膜Fを設置して、インサート材110を作製する。そして、このインサート材110を底部側金型150に形成されたキャビティ151内に設置する。

なお、予めインサート材110を作製しておいてもよい。また、インサート材110の作製およびインサート材110の設置は、公知の組み立てロボットなどを用いて行うのが好ましい。

[0064] (型閉じおよび核酸吸着性多孔性膜Fの保持)

次に、図3(b)に示すように、インサート材110を設置した底部側金型150に、バレ

ル側金型160を組み合わせて型閉じを行う。

- [0065] バレル側金型160は、核酸分離精製カートリッジ100の中空部143に相当する位置に、円柱状のコアピン161を備えている。コアピン161は、両金型150、160を閉じたときに、コアピン161の先端部162が核酸吸着性多孔性膜Fの上面に当接して、底部材120の挟持面125との間で核酸吸着性多孔性膜Fを挟み込むようになっている。このとき、核酸吸着性多孔性膜Fは、次工程で注入する樹脂Jが漏れない程度に、所定の厚さまで圧縮される。換言すれば、コアピン161は、次工程で注入する樹脂Jが漏れない程度の厚さまで核酸吸着性多孔性膜Fを圧縮するように、その長さが調節されている。核酸吸着性多孔性膜Fの固定(押圧)については後に詳しく説明する。

また、バレル側金型160は、樹脂Jを注入するためのゲート163を備えており、キャビティ151に樹脂Jを注入可能となっている。

- [0066] (樹脂注入)

次に、図4(a)に示すように、底部側金型150とバレル側金型160とインサート材110によって形成されたキャビティ151に、溶融した樹脂Jを、ゲート163から射出する。このとき、キャビティ151内に充填された樹脂Jの射出圧力によって、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faが押し潰される。換言すれば、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faが好適に押し潰される程度の射出圧力をかけて、溶融した樹脂Jをキャビティ151に充填する。これについては後に詳しく説明する。

- [0067] (型開きおよび核酸分離精製カートリッジ100の取り出し)

そして、図4(b)に示すように、樹脂Jの充填が完了し、樹脂Jが冷えて硬化したら、射出成形機(図示せず)を操作して型開きを行い、核酸分離精製カートリッジ100を取り出す。

- [0068] ここで、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faが、注入された樹脂Jによって圧縮されて保持される様子について、図5を参照して詳しく説明する。参照する図面において、図5は、図4(b)のA部を拡大して示した断面図であり、(a)は型閉じ時、(b)は型閉じ完了時、(c)は樹脂注入時、(d)は注入完了時の状態をそれぞれ示している。

- [0069] はじめに、型閉じ時においては、図5(a)に示すように、底部側金型150のキャビテ

ィ151内にインサート材110として底部材120と核酸吸着性多孔性膜Fが設置されている。核酸吸着性多孔性膜Fは、底部材120の底部121に形成された挟持面125上に周縁部Faが当接するように載置されている。この状態で、射出成形機(図示せず)を操作して、バレル側金型160を降下させる。

[0070] バレル側金型160のコアピン161の直径は、底部材120の底部側融着部123の内径よりも小さく、かつ、挟持面125の内径よりも大きいように形成されている。したがって、型閉じが完了すると、コアピン161の先端部162の周縁部162aは、図5(b)に示すように、挟持面125の内周側端縁部との間において、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faの一部を挟み込むこととなる。

[0071] また、コアピン161の先端部162は、リブ126の上端面の傾斜に合わせて、周縁部162aから中心に向かって傾斜するように形成されている。したがって、型閉じが完了すると、核酸吸着性多孔性膜Fは、図5(b)に示すように、リブ126の上端面とコアピン161の先端部162との間、並びに挟持面125の内周側端縁部とコアピン161の先端部162の周縁部162aとの間に挟まれて保持される。

なお、このようにコアピン161の先端部162が底部121の形状に合わせて山形状(錐状体形状)に形成されていることから、コアピン161は底部材120の中心へ自律的に調心される。そのため、コアピン161が偏心することがなく、所定の部材厚さ(キャビティ151aの空隙の幅)を確保することができる。

[0072] コアピン161による核酸吸着性多孔性膜Fの圧縮の程度は、核酸吸着性多孔性膜Fを破くことがなく、かつ、樹脂Jの射出圧力によって核酸吸着性多孔性膜Fがずれたりしわが寄ったり、樹脂Jが漏れたりしない程度に圧縮する必要がある。具体的には、膜厚の10%から70%程度の厚さに圧縮するのが好適である。

[0073] このようにして核酸吸着性多孔性膜Fが圧縮(保持)されると、この核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faと底部側融着部123の内周面123aとコアピン161の外周面161aとによって、バレル140のバレル側融着部142(図1参照)を成形するためのキャビティ151aが形成される。このとき、コアピン161の先端部162からはみ出している核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faは圧縮されていない。

なお、コアピン161が樹脂Jの注入圧によって僅かに傾いたり、底部側融着部123

の部材厚さに誤差が生じたりすることを考慮して、キャビティ151aの空隙の幅W(図5(b)参照)は、0.2mm以上とするのが好ましく、0.5mm以上とするのがより好ましい。

[0074] そして、ゲート163(図4(a)参照)から樹脂Jを注入すると、図5(c)に示すように、キャビティ151aに溶融した樹脂Jが充填される。このとき、溶融した樹脂Jは、核酸吸着性多孔性膜Fに染み込まず、キャビティ151aに面した核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faを溶融した樹脂Jの液圧によって押圧する。したがって、所定の射出圧力で樹脂Jを射出することにより、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faを所定の厚さに圧縮することができる。具体的には、当該周縁部Faの内部の空隙が無くなるまで圧縮する。例えば、発明者による実験の結果、鹼化処理を施したトリアセチルセルロース製の核酸吸着性多孔性膜F(膜厚80 μm)の場合、30 μm まで圧縮することにより、試料溶液の回り込みを防止できることが確認されている。このとき、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faの一部は、挟持面125の内周側端縁部とコアピン161の周縁部162aとによって環状に挟み込まれているので、キャビティ151aに注入された樹脂Jが核酸吸着性多孔性膜Fの中央側に流れ込むことがない。

[0075] また、鹼化処理を施したトリアセチルセルロース製の核酸吸着性多孔性膜F(膜厚80 μm)と、樹脂Jとして樹脂温度200℃のポリプロピレンを用いて、樹脂Jの射出圧力について実験を行った結果、樹脂Jの射出圧力が14.7MPa(150kgf/cm²)以下の場合には、コアピン161の周囲からはみ出した核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faを圧縮しきれず、その膜厚は60 μm 程度であり、内部の空隙をつぶしきれいでなかった。また、このようにして製造された核酸分離精製カートリッジ100を使用したところ、試料溶液が核酸吸着性多孔性膜Fの側面に回りこんでしまった。一方、射出圧力が147MPa(1500kg/cm²)以上の場合には、製造時に核酸吸着性多孔性膜Fが破れてしまった。したがって、樹脂Jの射出圧力は14.7MPaより大きく147MPaより小さい範囲で設定するのがよい。

[0076] 図5(d)に示すように、樹脂Jが硬化してバレル140が成形された後に型開きを行うと、バレル140の中空部143からコアピン161が抜き取られる。このとき、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faは、射出成形されたバレル側融着部142と挟持面125に挟

まれて挟持されており、核酸分離精製カートリッジ100の底部121において支持される。また、底部側融着部123の内周面123aは、注入時の樹脂Jの熱により溶融し、バレル側融着部142の外周面142aと一体化する。

[0077] これにより、バレル140が成形されると同時に核酸吸着性多孔性膜Fが保持されることとなり、従来のようにカートリッジを構成する2つの部品を固着するための専用装置が不要となる。また、樹脂Jの射出圧力により核酸吸着性多孔性膜Fを圧縮して保持するため、部品の寸法誤差による核酸吸着性多孔性膜Fのシール不足や破れを心配する必要がない。

[0078] (核酸分離精製カートリッジ100の使用方法)

続いて、核酸分離精製カートリッジ100の使用方法について説明する。参照する図6は、第1実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。

[0079] 核酸分離精製カートリッジ100を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、この工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。これにより、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の核酸を得ることが可能になる。

[0080] 例えば、前記した自動装置(図示せず)は、核酸分離精製カートリッジ100のバレル140の第1開口143aからノズル122の第2開口122aへ向けて、核酸を含む試料溶液を、加圧ガスの一例である加圧エアにより通流させることで、核酸吸着性多孔性膜Fに核酸を吸着させた後、同様に洗浄液 S_2 を通流させて不純物を除去し、続いて、同様に回収液を通流させて核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を離脱させ、回収液と共に回収する分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、核酸分離精製カートリッジ100と試料溶液および洗浄液 S_2 の排出液を収容する廃液容器と核酸を含む回収液を収容する回収容器とを保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジ100に加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、核酸分離精製カートリッジ100に洗浄液 S_2 および回収液を分注する分注機構とを備えているものを使用することができる。

[0081] 前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、このスタンドに上下移動可能に支持され核酸分離精製カートリッジ100を保持するカートリッジホルダーと、このカ

ートリッジホルダーの下方で核酸分離精製カートリッジ100に対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

[0082] また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、このエアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された核酸分離精製カートリッジ100に対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、この加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジ100の位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

[0083] また、前記分注機構は、洗浄液 S_2 を分注する洗浄液分注ノズルと、回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し、前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ100上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液 S_2 を収容した洗浄液ボトルより洗浄液 S_2 を吸引し、前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を収容した回収液ボトルより回収液を吸引し、前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

[0084] 本発明において使用できる検体に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（またはその一部）、動物（またはその一部）等、あるいはそれらの溶解物およびホモジネート等の生物材料から調製された溶液が対象となる。

[0085] 最初にこれらの検体について細胞膜および核膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。例えば、検体が全血の場合、これに塩酸グアニジン、Tris、Triton-X100、プロテアーゼK（SIGMA製）を添加し、60℃で10分インキュベートすることによって赤血球の除去、各種タンパク質の除去、白血球の溶解および核膜の溶解がなされる。

[0086] このようにして得られた試料溶液を、バレル140の中空部143に投入し（図6参照）、ノズル122へ向けて圧力をかけて通流させる。こうすると、試料溶液中の核酸が核酸吸着性多孔性膜Fに吸着される。

- [0087] 次に、図6に示すように、洗浄液 S_2 をバレル140の第1開口143aからノズル122へ向けて圧力をかけながら通流させる。この洗浄液 S_2 は、核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を離脱させずに、不純物を離脱させる組成を有するものである。この洗浄工程において、加圧した際、図6に示すように、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ126の傾斜形状に沿って、ノズル122側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液 S_2 が、底部121に残留することなく、速やかにノズル122から排出される。
- [0088] 洗浄液 S_2 は、水溶性有機溶媒および塩の双方、または水溶性有機溶媒もしくは塩のうちいずれか1つを含んでいる溶液であることが好ましい。アルコール等の水溶性有機溶媒は、核酸が難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を離脱させるのに適している。また、塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まる。
- [0089] 洗浄液 S_2 に含まれる水溶性有機溶媒として、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、アセトン等を用いることができるが、エタノールを用いることが好ましい。また、洗浄液 S_2 に含まれる水溶性有機溶媒は、好ましくは20～100容量%であり、より好ましくは40～80容量%である。
- [0090] また、洗浄液 S_2 に含まれる塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましい。さらには、塩が、一価または二価のカチオンを有し、かつその塩が10mM以上含まれていることが好ましい。より好ましくは、塩が、塩化ナトリウムであり、さらには、この塩化ナトリウムが20mM以上含まれていることが好ましい。
- [0091] 次に、精製蒸留水またはTEバッファ等の回収液をバレル140の第1開口143aからノズル122へ向けて圧力をかけながら通流させ、核酸を核酸吸着性多孔性膜Fから離脱させて流し出し、ノズル122から排出された回収液(核酸を含有する回収液)を回収する。
- [0092] なお、回収液は、検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱離を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 μ lであるが、検体量が極微量であるときや、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は1 μ lから数10mlの範囲で変えることができる。
- [0093] 回収液のpHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが

好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。このため、回収液は、290mモル/l以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90mモル/l以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。

また、回収される核酸は、デオキシリボ核酸(DNA)あるいはリボ核酸(RNA)であってもよく、さらに、これら核酸において1本鎖あるいは2本鎖のものであってもよい。

[0094] ここで特に、回収対象とされる核酸がRNAである場合、RNA分解酵素(RNase)を不活性化させることが望ましい。特に、洗浄液S₂や回収液を作製する水は、DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)処理したものを用いることが望ましい。

[0095] このようにして得られた回収液に含まれる核酸は、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6〜2.0、RNAの場合は1.8〜2.2となる純度を有する。すなわち、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

[0096] なお、核酸分離精製カートリッジ100は前記のように自動装置によって好適に使用することができるが、手動で操作する場合であっても用いることができる。この場合、試料溶液等を加圧する手段としては、注射器、ピペッタを用いることができる。注射器やピペッタは、核酸分離精製カートリッジ100の一の開口(第1開口143a側)に着脱可能に結合することができる。

[0097] (各部材の材料等)

バレル140および底部材120の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル等のプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好適に使用することができる。また、バレル140および底部材120は透明であっても、着色してあってもよい。

[0098] 核酸吸着性多孔性膜Fとしては、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する多孔性膜が好適である。より好適には、核酸吸着性多孔性膜Fは、親水基を有する多孔性膜であり、多孔性膜を形成する材料自体が、親水基を有する多孔性

膜、または多孔性膜を形成する材料を処理もしくはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜である。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでもよい。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜等を使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子等の有機材料を用いることが好ましい。

[0099] 親水基を有する多孔性膜としては、水酸基を有する有機材料の多孔性膜を挙げることができる。水酸基を有する有機材料としては、前記した特許文献1に記載のアセチルセルロースの表面鹸化物が挙げられる。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースのいずれでもよいが、特にトリアセチルセルロースが好ましい。この場合、鹸化处理の程度(鹸化度)で固相表面の水酸基の量(密度)をコントロールすることができる。核酸の分離効率を挙げるためには、水酸基の量(密度)が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロース等のアセチルセルロースの場合には、鹸化率が5%以上であることが好ましく、10%以上であることがより好ましい。また、鹸化处理の程度(鹸化度)と多孔性膜の孔径との組合せにより、固相内部の水酸基の量(密度)をコントロールすることができる。この場合、多孔性膜は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、表裏非対称性の多孔性膜を好適に使用することができる。

[0100] また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜として、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物からなる有機高分子の多孔性膜も好適に使用することができる。特にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物としては、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好適に使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、99:1〜1:99であることが好ましい。よ

り好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、90:10ー50:50である。

[0101] アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物も使用することができる。

[0102] また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料からなる多孔性膜を挙げることができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料は、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の鹸化物を好適に使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、99:1ー1:99である事が好ましい。さらには、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は、90:10ー50:50であることが好ましい。

[0103] アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料として、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物も使用することができる。

[0104] また、核酸吸着性多孔性膜Fには、厚さが10ー500 μm である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、厚さが50ー250 μm である多孔性膜を使用することができる。

[0105] また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最小孔径が0.22 μm 以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、最小孔径が0.5 μm 以上である多孔性膜を使用することができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、最大孔径と最小孔径の比が5以上である多孔性膜を使用することができる。

[0106] また、核酸吸着性多孔性膜Fには、空隙率が50ー95%である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、空隙率が65ー80%である多孔性膜を使用す

ることができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、バブルポイントが、9.8ー980kPa (0.1ー10kgf/cm²)である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、バブルポイントが、19.6ー392kPa (0.2ー4kgf/cm²)である多孔性膜を使用することができる。

[0107] また、核酸吸着性多孔性膜Fには、圧力損失が、0.1ー100kPaである多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、圧力損失が、0.5ー50kPaである多孔性膜を使用することができる。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ100μmあたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

[0108] また、核酸吸着性多孔性膜Fには、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.1μg以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.9μg以上である多孔性膜を使用することができる。

[0109] [第2実施形態]

続いて、本発明の第2実施形態について説明する。参照する図面において、図7は、第2実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ群の斜視図である。

[0110] 核酸分離精製カートリッジ群190は、図7に示すように、多数個の核酸分離精製カートリッジ192が連続して成形されたものである。

[0111] 核酸分離精製カートリッジ群190を構成する核酸分離精製カートリッジ192は、第1実施形態において説明した核酸分離精製カートリッジ100と、その構造をほとんど同じくするものであるが、隣り合う核酸分離精製カートリッジ192の一部(接続部193)で互いに連続している。

[0112] 核酸分離精製カートリッジ群190は、互いに連通した多数のキャビティ151(図3参照)が形成された射出成型型(図示省略)を用いて作製される。そのため、多数のキャビティ151にセットされた多数の核酸吸着性多孔性膜Fの周縁部Faを押圧する樹脂Jの圧力が均等となる。したがって、核酸吸着性多孔性膜Fを押圧する力のばらつきによって核酸吸着性多孔性膜Fが破れたりシール不足となったりすることがなく、一度に多数個の核酸分離精製カートリッジ192(核酸分離精製カートリッジ群190)を効率よく製造することができる。

[0113] 以上、本発明に係る核酸分離精製カートリッジの第1実施形態及び第2実施形態に

ついて説明したが、本発明は前記の実施形態には限定されない。例えば、第2実施形態にかかる核酸分離精製カートリッジ群190は、核酸分離精製カートリッジ192同士が直接連結された状態となっているが、キャビティ間をランナーで連通した射出成形型で射出成形することにより、核酸分離精製カートリッジ192が直接連結しない構成とすることができる。また、第1実施形態における核酸分離精製カートリッジ100は、前記ランナーで連通させて射出成形した後に、当該ランナーを切除して、多数の核酸分離精製カートリッジ100を製造するようにしてもよい。

[0114] [第3実施形態]

次に、本発明の第3実施形態について、適宜図面を参照しながら説明する。参照する図8は、本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図であり、図9は、本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図であり、図10は、本発明の第3実施形態に用いられるキャップの拡大断面斜視図であり、図11は、図10のX-X線断面図であり、図12は図9のB部における拡大図であり、図13は、本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの洗浄工程を示す断面図である。なお、以下の説明において、「上」、「下」の表現は、図9を基準とする。

[0115] 図8に示すように、本発明の第3実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ200は、核酸吸着性多孔性膜Fと、核酸吸着性多孔性膜Fを保持するとともに、液体が通流する通路を形成する筒状体であるバレル210およびキャップ220とから構成されている。

[0116] (バレル210)

バレル210は、円筒状のバレル本体部212と、バレル本体部212に連なる円筒状のバレル側嵌合部213とからなり、バレル本体部212の上部には第1開口211a、バレル側嵌合部213の下部には開口211bが形成されている。そのため、バレル210の上方から下方に向けて、液体が通流可能である。また、バレル側嵌合部213の外径は、バレル本体部212の外径より一回り小さくなっている。

[0117] (キャップ220)

キャップ220は、円筒状のキャップ側嵌合部222と、キャップ側嵌合部222の底部222aに設けられた開口223に連なる排出部224とからなる。底部222aに設けられた

底部開口の一例である開口223は、前記したバレル本体部212の上部に設けられた第1開口211aより小さい径を有している。また、キャップ側嵌合部222の上部には開口221a、排出部224の下部には第2開口221bが形成されている。そのため、キャップ220の上方から下方へ向けて、液体が通流可能である。また、キャップ側嵌合部222の内径は、前記バレル210のバレル側嵌合部213の外径と嵌合可能な直径に形成されている。

[0118] そして、図9に示すように、キャップ220のキャップ側嵌合部222の底部222aに、核酸吸着性多孔性膜Fを配置した状態で、バレル210のバレル側嵌合部213をキャップ220のキャップ側嵌合部222へ嵌入することで、核酸吸着性多孔性膜Fをバレル210とキャップ220との間で挟持することができる。なお、バレル210とキャップ側嵌合部222とから「筒状本体」が構成される。

[0119] キャップ220は、図10に示すように、キャップ側嵌合部222の底面222bに、6本（図においては3本のみ図示）の放射状のリブ226が形成されている。このリブ226は、核酸分離精製カートリッジ200が組み立てられた状態において、それぞれの外周側端部226aの頂部226cが核酸吸着性多孔性膜Fに当接し、核酸吸着性多孔性膜Fを支持している（図9参照）。また、リブ226は、核酸分離精製カートリッジ200の使用時において、核酸吸着性多孔性膜Fが開口223に近づくほど排出部224の方へ変位するように、外周側端部226aから内部側端部226bに向けて、排出部224側に傾斜している。また、底面222bの外周縁には、リブ226の外周側端部226aに連なるように、底面222bから一段高くなった挟持面225が、全周にわたって形成されている。この挟持面225は、バレル210の開口211bの端縁にあたる開口縁部214（図8参照）との間で、核酸吸着性多孔性膜Fを挟持する面である。この挟持面225の幅は、開口縁部214の幅に合わせて形成するのが好ましい。なお、リブ226は「突起」の一例であり、「突起」は必ずしもリブ形状でなく、山形の突起を複数散点的に形成してもよい。

[0120] (リブ226)

リブ226は、放射状に形成されているため、液体を上方から下方へ流した際に、液体が排出部224へスムーズに流れ込むようになっている。

また、リブ226は、外周側端部226aから内部側端部226bに向けて、その頂部226cが排出部224側に傾斜しているため、洗浄工程において、後記する洗浄液 S_2 (図13参照)を加圧ガスにより通流させる際、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ226の頂部226cに沿って、排出部224側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液 S_2 が、底部222aに残留することなく、速やかに排出部224から排出される。なお、キャップ側嵌合部222の径方向に対するリブ226の傾斜角度 θ_1 (図12参照)は、好ましくは 3° 以上、より好ましくは 5° 以上である。

[0121] また、図11に示すように、リブ226は、横断面で見たときに、頂部226cが円弧状に形成されている。これにより、リブ226の頂部226cと核酸吸着性多孔性膜Fとの間に洗浄液 S_2 が滞留し難くなるので、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。なお、リブ226の頂部226cの曲率半径はリブ226の幅に対して $1/4$ 以上が好ましく、より好ましくは $1/3$ 以上、最も好ましくは $1/2$ 以上である。

[0122] (核酸分離精製カートリッジ200の断面形状)

次に、核酸分離精製カートリッジ200の断面形状について、図12を参照して説明する。図12に示すように、キャップ側嵌合部222の底面222bは、開口223に近付くほど排出部224の方へ変位する傾斜を有している。これにより、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。また、キャップ側嵌合部222の径方向に対する底面222bの傾斜角度 θ_2 は、好ましくは 10° 以上、より好ましくは 15° 以上、最も好ましくは 20° 以上である。

[0123] また図12に示すように、核酸分離精製カートリッジ200は、内面に存在する角部(例えば開口223の縁部223a等)および隅部(例えば底面222bの外周縁部222c等)が円弧状に形成されている。これにより、内面に存在する角部および隅部に、洗浄液 S_2 が滞留し難くなるので、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。なお、角部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.2mm 以上、最も好ましくは 0.3mm 以上である。また、隅部の曲率半径は 0.1mm 以上が好ましく、より好ましくは 0.15mm 以上、最も好ましくは 0.2mm 以上である。

[0124] また、バレル210の軸とバレル210の内周面210aとがなす角度 θ_3 は、好ましくは 10° 以下、より好ましくは 5° 以下である。これにより、洗浄液 S_2 がバレル210の内周

面210aを伝って流れ易くなるので、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。

- [0125] また、核酸吸着性多孔性膜Fは、バレル210の開口縁部214とキャップ220の挟持面225との間に、その周縁部Faが潰れた状態で保持されている。これにより、核酸吸着性多孔性膜Fを通るべき液体(試料溶液等)が、核酸吸着性多孔性膜Fの側部Fbに回り込む不具合を防ぐことができる。この核酸吸着性多孔性膜Fを安定して保持するためには、開口縁部214と挟持面225とを超音波溶着等により固着するのが好ましい。
- [0126] なお、バレル210、キャップ220および核酸吸着性多孔性膜Fの材料については第1実施形態で説明しているので、その説明を省略する。また、核酸分離精製カートリッジ200を用いて核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程や、この工程を自動で行う自動装置などについても前記の第1実施形態の説明の中で既に説明しているので、その説明を省略する。
- [0127] (核酸分離精製カートリッジ200の作用および効果)
- 続いて、核酸分離精製カートリッジ200の作用および効果について説明する。
- まず、核酸を含む試料溶液を、バレル210の第1開口211a(図9参照)から排出部224の第2開口221bへ向けて、加圧エアにより通流させる。これにより、試料溶液中の核酸が核酸吸着性多孔性膜Fに吸着される。
- [0128] 次に、図13に示すように、洗浄液 S_2 をバレル210の第1開口211aから排出部224の第2開口221bへ向けて加圧エアにより通流させる。この洗浄液 S_2 は、核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を離脱させずに、不純物を離脱させる組成を有するものである。この洗浄工程において、洗浄液 S_2 を加圧エアにより通流させる際、図13に示すように、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ226の傾斜形状に沿って、排出部224側に向かって凸状に変形する。これにより、洗浄液 S_2 が、底部222a、特に核酸吸着性多孔性膜Fとバレル210の内周面210aとにより形成される隅部227に残留することなく、速やかに排出部224から排出される。
- [0129] この際、核酸分離精製カートリッジ200の内壁面(バレル210の内周面210a等)に対する洗浄液 S_2 の液滴Wdの接触角が 90° 以上の場合は、例えば、図13に示すように、バレル210の内周面210aに液滴Wdとして残留しても、その液滴Wdは表面張

力により略球状となるため、加圧エアにより除去し易くなる。これにより、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。

また、核酸分離精製カートリッジ200の内壁面に対する洗浄液 S_2 の液滴Wdの接触角が 80° 以下である場合は、核酸分離精製カートリッジ200の内壁面に対する洗浄液 S_2 の濡れ性が向上し、洗浄液 S_2 が液滴Wdとして残留し難くなるため、洗浄液 S_2 がより速やかに排出される。

[0130] 一方、比較例として、キャップ側嵌合部222の径方向に対するリブ226の傾斜角度 $\theta 1$ (図12参照)を 0° にして、前記したように分離精製した場合は、排出された回収液中のエタノールの濃度は4容量%を超えていた。この排出された回収液を用いてPCRや逆転写酵素反応を行うと、収率の低下が見られた。

[0131] このように、本実施形態の核酸分離精製カートリッジ200では、洗浄工程において、洗浄液 S_2 が核酸分離精製カートリッジ200の内部に残留せずに、速やかに排出されるので、排出された回収液への洗浄液 S_2 の混入を抑えることができる。これにより、次工程において、洗浄液 S_2 に起因する不具合を未然に防ぐことができる。

[0132] なお、前記第3実施形態では、バレルをキャップへ嵌入することにより筒状体を形成したが、本発明はこれに限定されない。例えば、キャップを金型に設置し、バレル部分をインサート成形により形成することによって、バレルとキャップとが一体成形されたものを筒状体として用いてもよい。

[0133] [第4実施形態]

次に、本発明の核酸分離精製カートリッジの第4実施形態について適宜図面を参照しつつ説明する。参照する図面において、図14は、本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図であり、図15は、本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。また、図16は、本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部を拡大した断面図である。図17は、本発明の第5実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部を拡大した断面図である。図18は、本発明の第6実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部を拡大した断面図である。なお、以下の説明において、「上」、「下」の表現は、核酸分離精製カートリッジの使用状態、具体的には図15に示すような状態を基準とする。

[0134] (核酸分離精製カートリッジ300の構成)

まず、図14および図15を参照して、第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ300の全体的な構成について説明する。

発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ300は、核酸吸着性多孔性膜Fと、核酸吸着性多孔性膜Fを保持するとともに、溶液が通流する通路を形成するバレル310およびキャップ320とから構成されている。

[0135] 次に、図14の分解斜視図を参照して各構成部品について、より詳細に説明する。
(バレル310)

バレル310は、円筒状のバレル本体部312と、バレル本体部312に連なる円筒状のバレル側嵌合部313とからなり、バレル本体部312の上部には第1開口311、バレル側嵌合部313の下部には開口314が形成されている。そのため、バレル310の上方から下方に向けて、溶液等S(図15参照)が通流可能である。また、バレル側嵌合部313の外径は、バレル本体部312の外径より一回り小さくなっている。

[0136] (キャップ320)

キャップ320は、円筒状のキャップ側嵌合部325と、キャップ側嵌合部325の底部322に設けられた底部開口323に連なる排出部302とからなる。底部322に設けられた底部開口323は、前記したバレル本体部312の上部に設けられた第1開口311より小さい径を有している。また、キャップ側嵌合部325の上部には開口327が形成され、排出部302の下部には第2開口321が形成されている。そのため、キャップ320の上方から下方へ向けて、液体が通流可能である。また、キャップ側嵌合部325の内径は、前記バレル310のバレル側嵌合部313の外径と嵌合可能な直径に形成されている。

[0137] そして、図15に示すように、キャップ320のキャップ側嵌合部325の底部322に、核酸吸着性多孔性膜Fを配置した状態で、バレル310のバレル側嵌合部313をキャップ320のキャップ側嵌合部325へ嵌入することで、核酸吸着性多孔性膜Fをバレル310とキャップ320との間で挟持することができる。また、キャップ320の底部322には少なくとも3本、好ましくは6本の放射状に形成されたリブ326が形成されている。そして、このリブ326の角部は、キャップ側嵌合部325の底部322の中心に設けられた底

部開口323に向かって下り傾斜形状を呈するように形成されている。

なお、バレル310と、キャップ側嵌合部325と、底部322とから「筒状本体」が構成される。また、キャップ320の底部開口323と第2開口321とを連通する筒として構成される排出部302が「排出部」に相当し、この筒状本体と排出部とで筒状に構成されるものが「筒状体」に相当する。

[0138] (排出部302および端面324の構成)

次に、本発明の第4実施形態に係る核酸分離精製カートリッジ300の排出部302や排出部302の端面304の好適な構成について、図14および図15を参照しつつ、図16および図17を参照して詳細に説明する。

[0139] 図16の拡大断面図に示すように、核酸分離精製カートリッジ300の排出部302は、キャップ320の下半分を構成するものであり、筒状本体の底部322の底部開口323に一端が連なり、他端が廃液を排出するための第2開口321を形成する筒として構成されている。このように構成することにより、核酸分離精製カートリッジ300の下部に配置された廃液容器400(図20参照)へ向かって正確に廃液を導くことができる。これは、例えば、後記する自動装置によって当該核酸分離精製カートリッジ300を多連で使用した場合に、他サンプルの溶液へのコンタミネーション防止に有効である。

なお、このキャップ320の第2開口321を形成する部分の端面324の肉厚 T は、0.2mm以上に構成するのがよい。第2開口321を形成する部分の肉厚 T を0.2mm以上となるように形成すれば、試料溶液 S_1 (図15参照)の泡がエアの巻き上げによって煽られた場合であっても、この第2開口321を形成する部分の肉厚 T を乗り越えて排出部302の外壁面302aに付着することはない。これは、肉厚 T を厚くするほど確実な効果がみられるので、肉厚 T を0.5mm以上に形成することがさらに好ましい。

[0140] また、核酸分離精製カートリッジ300におけるキャップ320の第2開口321の開口径 r は1.0mm以上に形成するのがよい。開口径 r を1.0mm以上に形成すると、廃液を良好に排出することができる。

[0141] さらに、キャップ320の端面324の外径 R は、1.4mm以上に形成するのがよい。排出部302の端面324の外径 R を1.4mm以上とすれば、前記した肉厚 T を0.2mm以上確保することができるほか、第2開口321を形成する部分の強度を高く保つこと

ができる。なお、前記理由により、この外径Rは、2.0mm以上であることがより好ましい。

[0142] 次に、同じく図16および図17を参照して、キャップ320の排出部302やキャップ320の端面324の形状について説明する。

キャップ320の排出部302は、端面324と外壁面302aとのなす角度 θ_4 を 105° 以下に構成するのがよい。このように構成することで、外壁面302aに泡が付着した場合であっても、泡は第2開口321の近傍に集まるので、洗浄液 S_2 によってこれを取り除くことができる。なお、排出部302の外壁面302aとのなす角度 θ_4 を 100° 以下とするのがより好ましく、 95° 以下とするのがさらに好ましい。

[0143] [第5実施形態]

また、本発明の核酸分離精製カートリッジに係る第4実施形態としては、図17に示すように、排出部302の端面324の形状を第2開口321へ近付くにつれ開口径rが広がる漏斗形状としてもよい。このようにすると、第2開口321の外縁部は外壁面302aと鋭角をもって形成されるので、下方からエアが巻き上がってきた場合であっても、泡は外縁部を越えて外壁面302aに付着し難くなる。

なお、この場合、排出部302の端面324と外壁面302aとのなす角度 θ_5 を、 30° 以上とするのがよい(図17参照)。 30° 未満とすると試料溶液 S_1 が端面324の外縁に集まり、前記した肉厚Tを確保した意味がなくなる。

[0144] また、端面324および外壁面302aの樹脂親水性を高めるのが好ましい。すなわち、核酸分離精製カートリッジ300を構成する材質を濡れ易いものとするのが好ましい。端面324および外壁面302aを親水性とすることにより、洗浄液 S_2 の撥水作用を抑え、かつ、洗浄液 S_2 による泡の引き込みを行うことができる。

なお、当該核酸分離精製カートリッジ300のパレル310およびキャップ320の内壁面302bにおける排水性を考慮すると、この内壁面302bは撥水性であることが好ましく、疎水性合成樹脂を用いて核酸分離精製カートリッジ300を作製することが好ましい。

[0145] ここで、疎水性合成樹脂を用いて作製した核酸分離精製カートリッジ300において、キャップ320の端面324と外壁面302aの親水性を高めるには、以下の処理を施す

ことにより行うことができる。

まず、疎水性合成樹脂であるポリスチレンを用いて射出成形により第2開口321側を封じた状態のキャップ320を作製する。このとき、必要であれば、第2開口321の形状を前記した任意の形状に加工するのがよい。そして、キャップ320の端面324と外壁面302a(好ましくは第2開口321となる近傍の外壁面302a)をプラズマ処理することによって、端面324および外壁面302aの親水性を向上させる。このようにすることで内壁面302bは撥水性が高く、排出部302の外壁面302aおよび端面324の親水性が高いキャップ320を得ることができる。

なお、キャップ320とバレル310とを一体的に成形した核酸分離精製カートリッジ300であっても同様の処理を行うことで端面324と外壁面302aの親水性を高くすることができる。

[0146] その他、疎水性合成樹脂に親水性を付与する方法としては、前記したプラズマ処理に限られることはなく、疎水性合成樹脂の表面を修飾し、親水性を向上させることのできる薬品等を用いることもできる。すなわち、射出成形したキャップ320の端面324および外壁面302aを当該薬品で処理することにより、外壁面302aおよび端面324の親水性を向上させたキャップ320を得ることができる。

[0147] [第6実施形態]

また、本発明の核酸分離精製カートリッジに係る第6実施形態としては、図18に示すように、キャップ320の端面324に、泡を誘導するための爪部材328を形成するのが好ましい。また、この爪部材328を棒状に形成するのがより好ましい。さらには、この爪部材328の内側の位置が内壁面302bと一致するように形成するのが好ましい。このように構成することで、第2開口321に到達した泡は、内壁面302bに延設された棒状の爪部材328を伝ってその先端部分、すなわち、第2開口321よりさらに下方位置で凝集し易くなり、廃液容器400に落ち易くなる結果、泡の外壁面302aへの付着を防止することができる。

なお、この棒状の爪部材328は前記した目的を達成することができればよく、1本から複数本の間で任意の数を設けることができる。

[0148] 次に、図15へ戻って説明を続けると、リブ326は、放射状に形成されているため、

液体を上方から下方へ流した際に、液体が排出部302へスムーズに流れ込むようになっている。

また、リブ326は、底部開口323側に下り傾斜形状を呈するように形成されているため、溶液等Sをバレル310の第1開口311側から加圧すると、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ326の傾斜形状に沿って、底部開口323側に向かって凸状に変形する。これにより、溶液等Sが、底部322に残留することなく、速やかに底部開口323から排出される。

[0149] なお、バレル310、キャップ320および核酸吸着性多孔性膜Fの材料については第1実施形態で説明しているので、その説明を省略する。また、核酸分離精製カートリッジ300を用いて核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程や、この工程を自動で行う自動装置などについても前記の第1実施形態の説明の中で既に説明しているので、その説明を省略する。

[0150] 以上、本発明に係る核酸分離精製カートリッジを実施するための最良の形態について説明したが、本発明は前記の実施形態には限定されない。例えば、前記した実施形態では、核酸吸着性多孔性膜を1枚収容した核酸分離精製カートリッジとしたが、核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジとしてもよい。この場合、収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

請求の範囲

- [1] 有底筒状の筒状本体の底部に開口を有し、前記底部に核酸吸着性多孔性膜を支持した核酸分離精製カートリッジであって、
前記核酸吸着性多孔性膜は、その周縁部が前記筒状本体の筒部を形成する成形材料により挟持され、
前記核酸吸着性多孔性膜を挟持する一方の部分である前記底部を形成する底部材に前記核酸吸着性多孔性膜を配置した上でこれらを射出成型型のキャビティ内にインサートし、さらにこのキャビティ内に成形材料を射出することで、前記核酸吸着性多孔性膜を挟持する他方の部分である前記筒状本体の筒部を形成する部分が前記底部材と一体化されて成形されると同時に、前記核酸吸着性多孔性膜を挟持したことを特徴とする核酸分離精製カートリッジ。
- [2] 前記底部材は、前記底部の開口に連通する筒状の排出部をさらに備えていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [3] 前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、前記筒状本体の筒部を形成する成形材料の射出圧力により押し潰されて挟持されていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [4] 前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、内部の空隙がなくなるまで押し潰されていることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [5] 前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部は、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰されていることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [6] 有底筒状の筒状本体の底部に開口を有し、前記底部に核酸吸着性多孔性膜を支持した核酸分離精製カートリッジの製造方法であって、
前記筒状本体の底部を有して前記筒状本体の一部を形成する底部材の該底部に、前記核酸吸着性多孔性膜を配置した状態で、前記底部材および前記核酸吸着性多孔性膜を射出成型型のキャビティ内に配置する工程と、
前記核酸吸着性多孔性膜にコアピンを押し当て、前記コアピンの周囲に前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部がはみ出した状態で前記核酸吸着性多孔性膜を保持す

るとともに射出成形型を閉じる工程と、

前記キャビティ内に成形材料を射出し、前記筒状本体の筒部を成形すると同時に、
前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を成形材料と前記底部とで挟持する工程と、

前記射出成形型から成形体を取り出す工程と、
を有することを特徴とする核酸分離精製カートリッジの製造方法。

- [7] 前記コアピンは、前記核酸吸着性多孔性膜を、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰して保持することを特徴とする請求の範囲第6項に記載の核酸分離精製カートリッジの製造方法。
- [8] 前記コアピンの先端部は、その周縁部から中心部に向かって円錐形状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第6項に記載の核酸分離精製カートリッジの製造方法。
- [9] 前記コアピンの周囲にはみ出した前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を、前記キャビティ内に射出された成形材料の射出圧力により、内部の空隙がなくなるまで押し潰すことを特徴とする請求の範囲第6項に記載の核酸分離精製カートリッジの製造方法。
- [10] 前記コアピンの周囲にはみ出した前記核酸吸着性多孔性膜の周縁部を、前記キャビティ内に射出された成形材料の射出圧力により、もとの膜厚の10%から70%の膜厚になるまで押し潰すことを特徴とする請求の範囲第6項に記載の核酸分離精製カートリッジの製造方法。
- [11] 請求の範囲第6項に記載された核酸分離精製カートリッジの製造方法であって、
前記射出成形型は前記キャビティを複数個備えており、
前記複数個のキャビティ内には前記底部材に前記核酸吸着性多孔性膜が配置された上でこれらがそれぞれインサートされ、
前記複数個のキャビティは互いに連通しており、
多数の前記核酸分離精製カートリッジを同時に製造可能なことを特徴とする核酸分離精製カートリッジの製造方法。
- [12] 第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流さ

せることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、

前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、

前記底部は、底面と、前記底面に形成された複数の突起とを有し、

前記複数の突起は、その頂部の少なくとも一部で前記核酸吸着性多孔性膜を支持し、かつ、使用時において、前記核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されていることを特徴とする核酸分離精製カートリッジ。

[13] 前記複数の突起は、前記底部開口から放射状に延びる複数のリブであることを特徴とする請求の範囲第12項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

[14] 前記リブは、頂部が円弧状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第13項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

[15] 前記底面は、前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位する傾斜を有することを特徴とする請求の範囲第12項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

[16] 前記核酸分離精製カートリッジは、内面に存在する角部および隅部が円弧状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第12項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

[17] 前記核酸吸着性多孔性膜は、その周縁部が潰れた状態で保持されていることを特徴とする請求の範囲第12項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

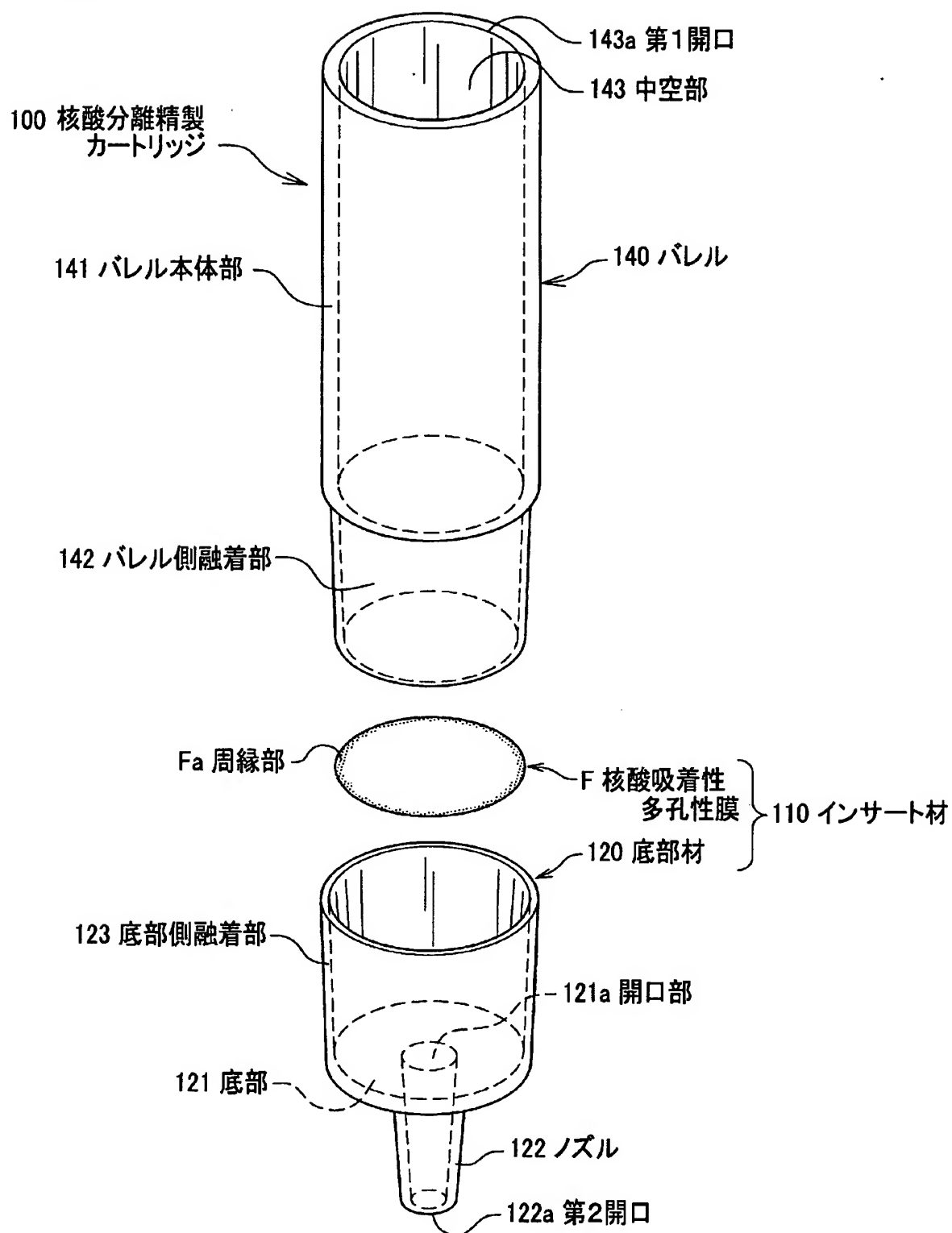
[18] 第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、

前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、

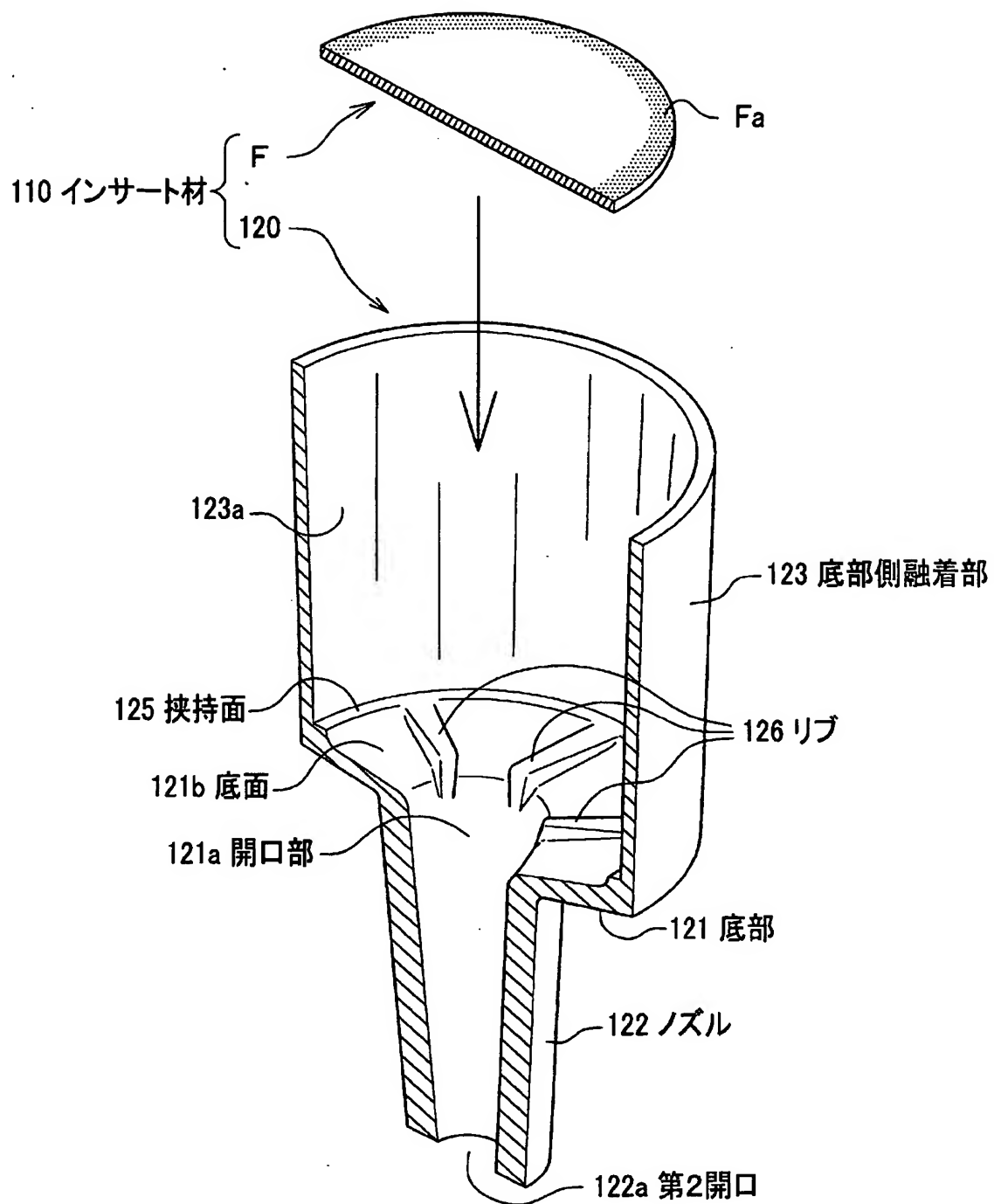
前記排出部の前記第2開口を形成する部分の肉厚は、0.2mm以上であることを特徴とする核酸分離精製カートリッジ。

- [19] 記第2開口の開口径が1.0mm以上であり、かつ、前記第2開口を形成する部分の外径が1.4mm以上であることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [20] 前記排出部の端面と、前記排出部の外壁面とのなす角度が、105°以下であることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [21] 前記排出部の端面の形状は、前記第2開口へ近づくにつれ開口径が広がる漏斗形状を呈することを特徴とする請求の範囲第18項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [22] 前記排出部は、その端面および外壁面の樹脂親水性が高められていることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の核酸分離精製カートリッジ。
- [23] 前記排出部の端面に、泡を誘導するための爪部材を備えることを特徴とする請求の範囲第18項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

[図1]

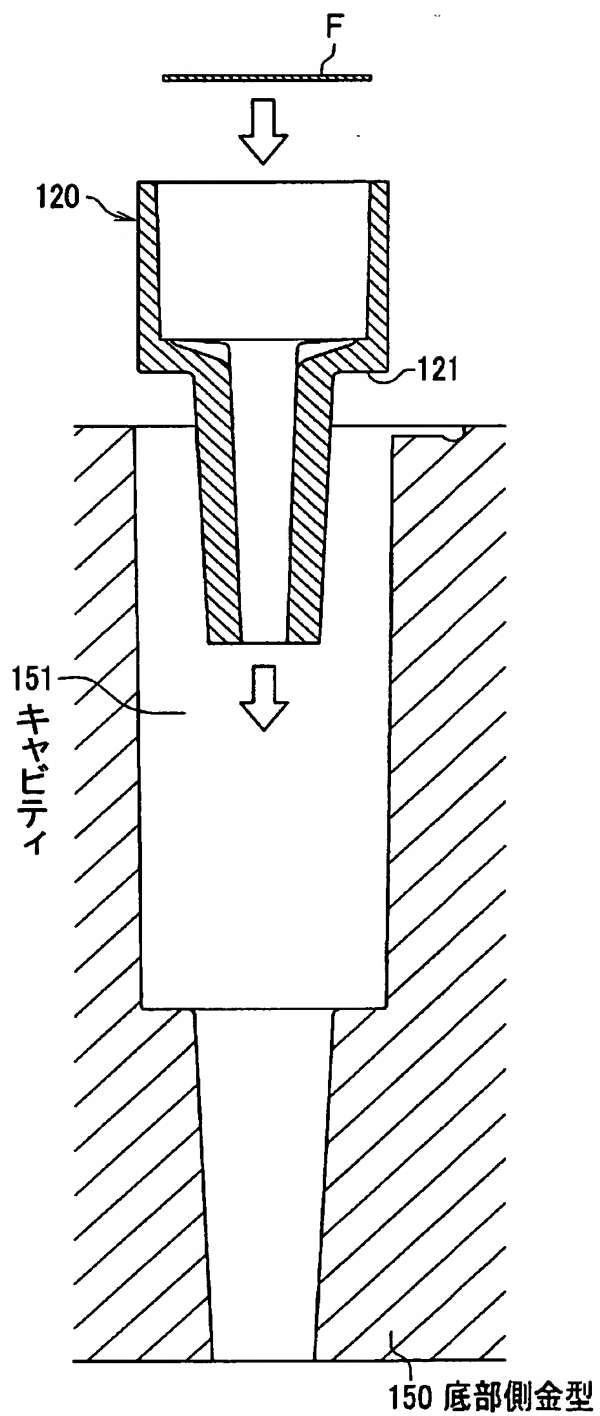


[図2]

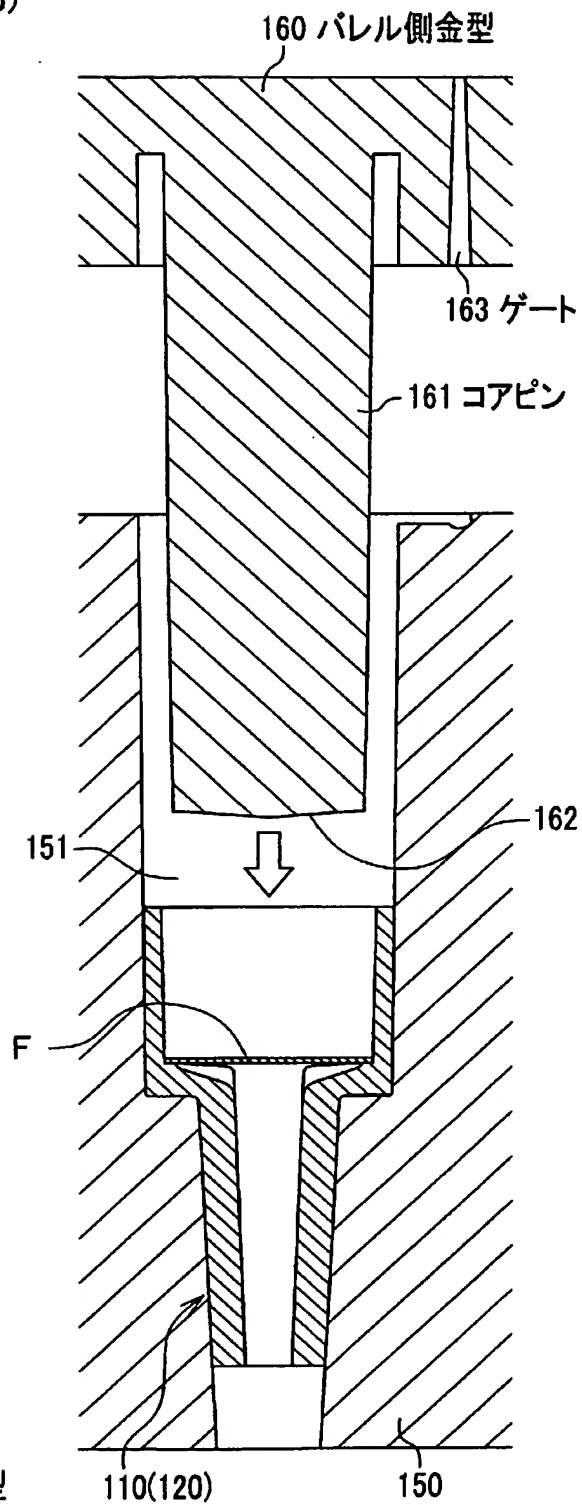


[図3]

(a)



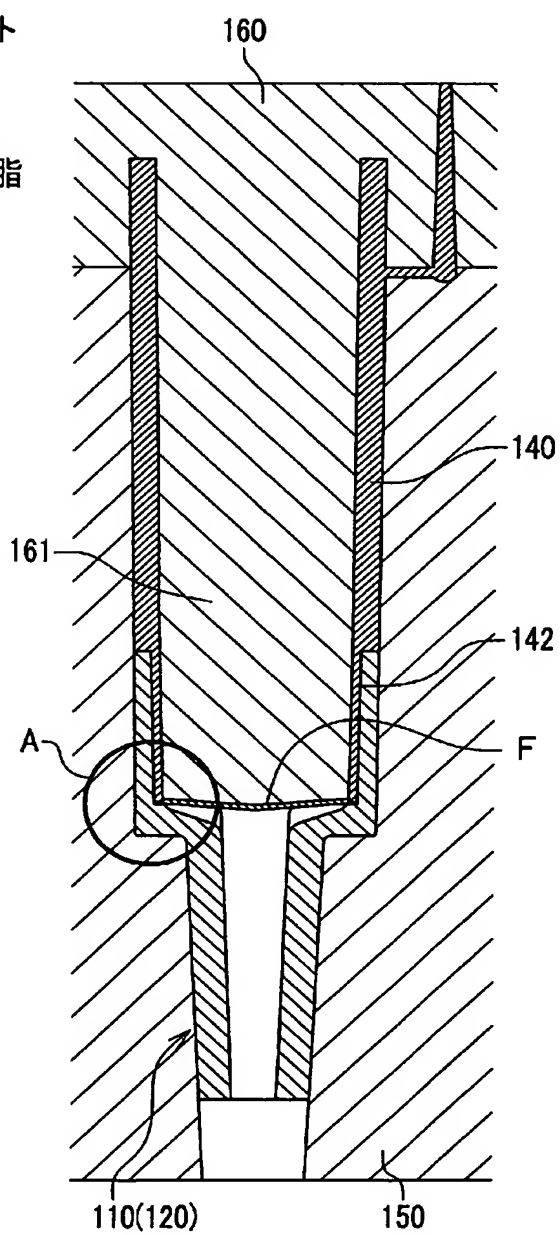
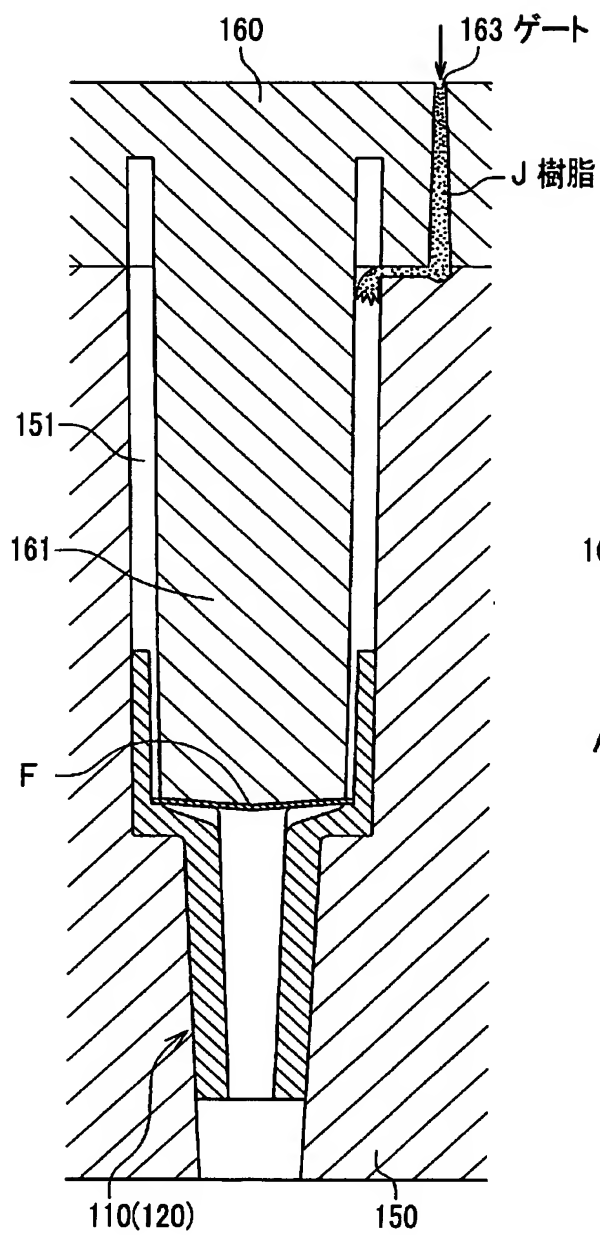
(b)



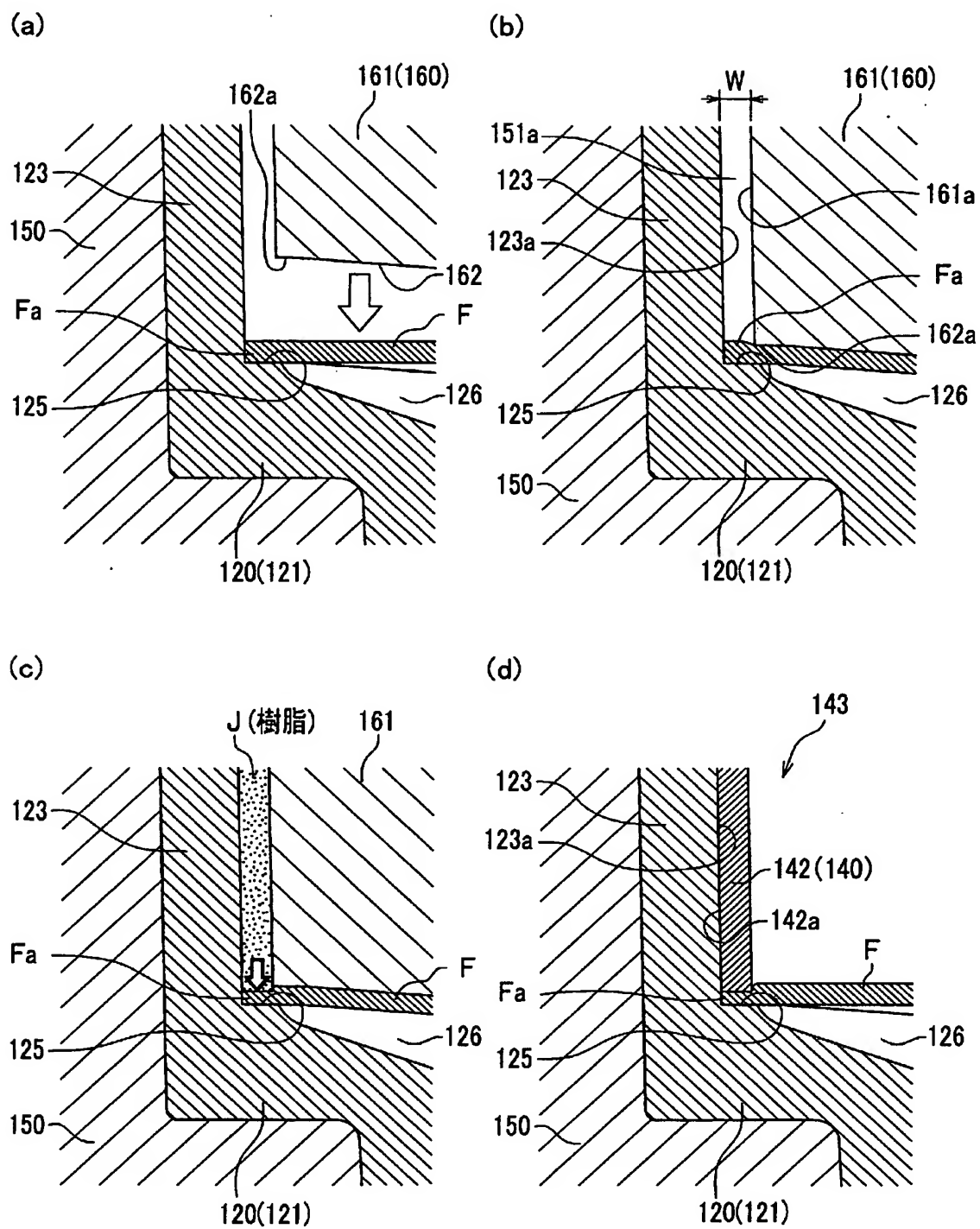
[図4]

(a)

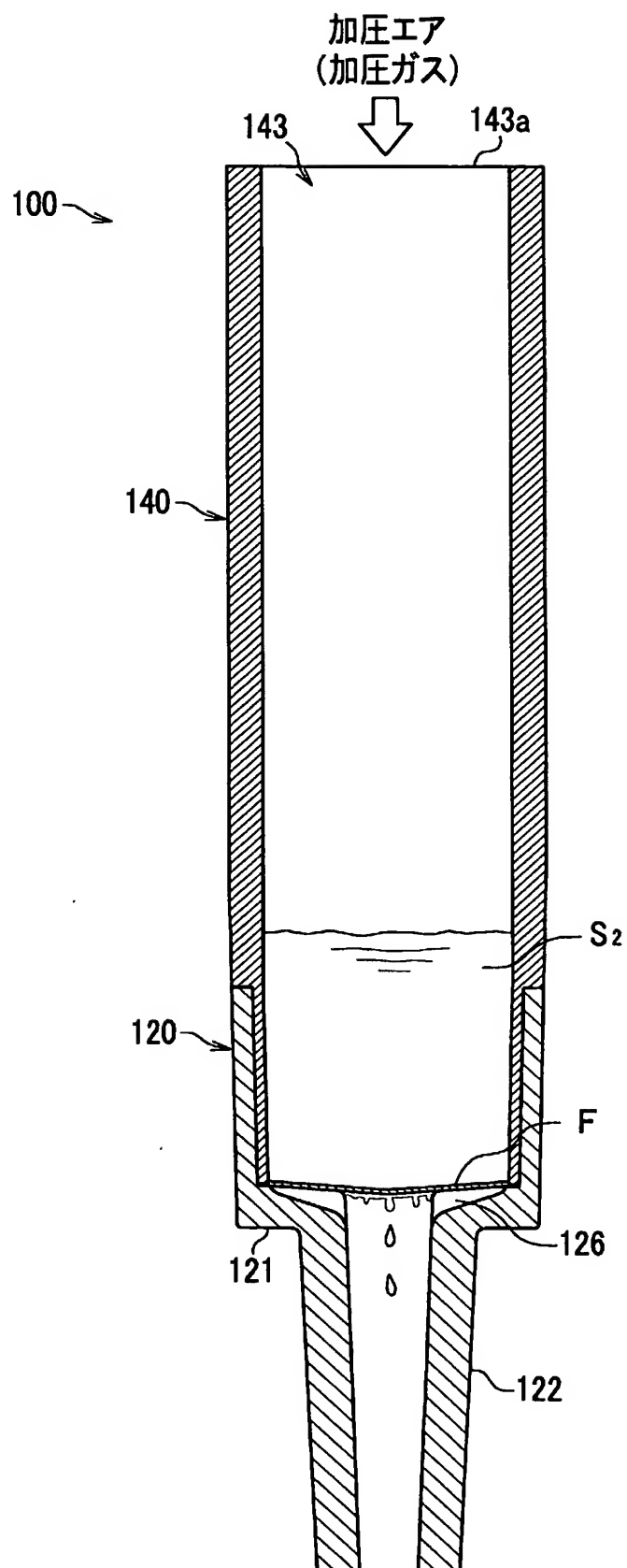
(b)



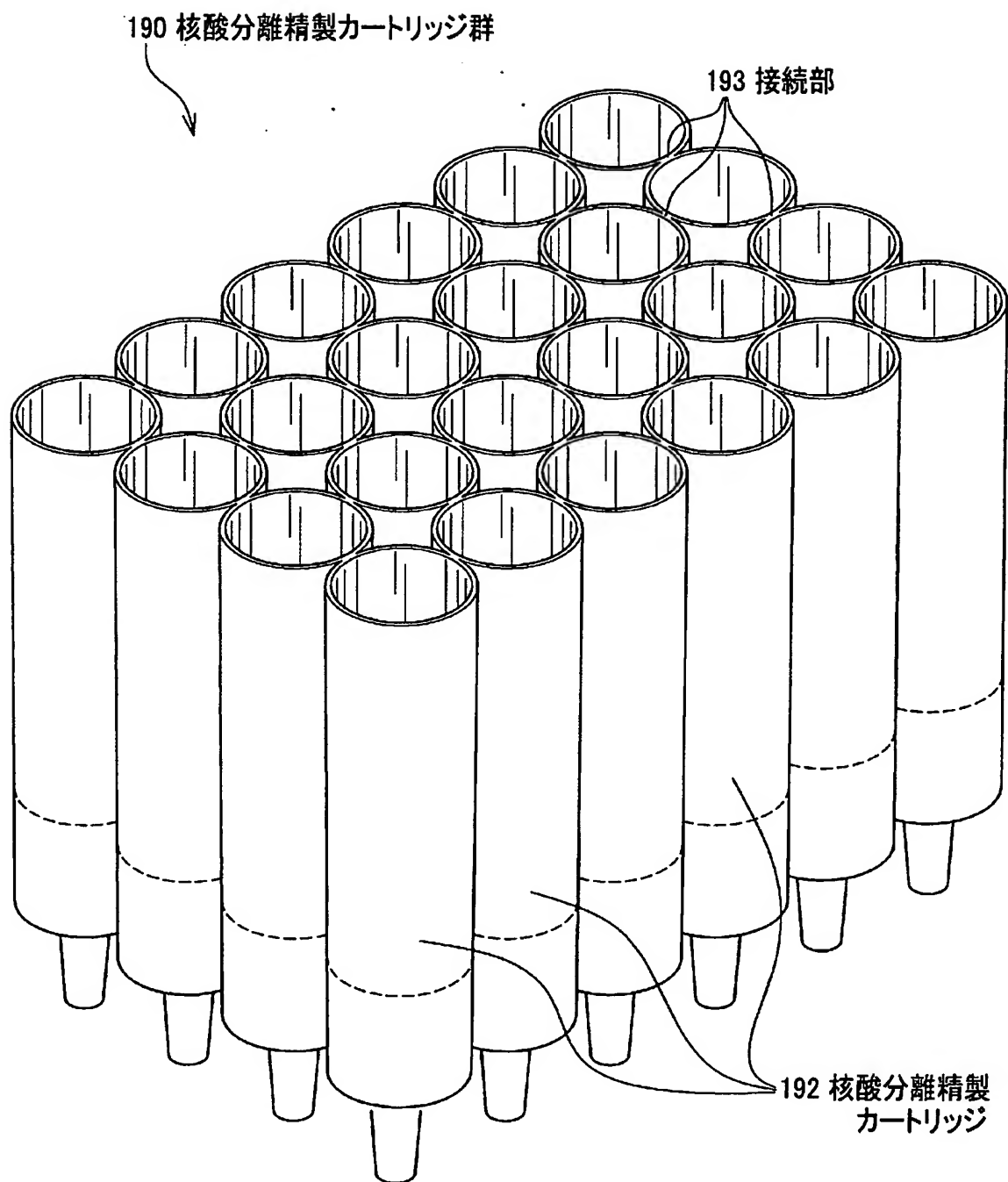
[図5]



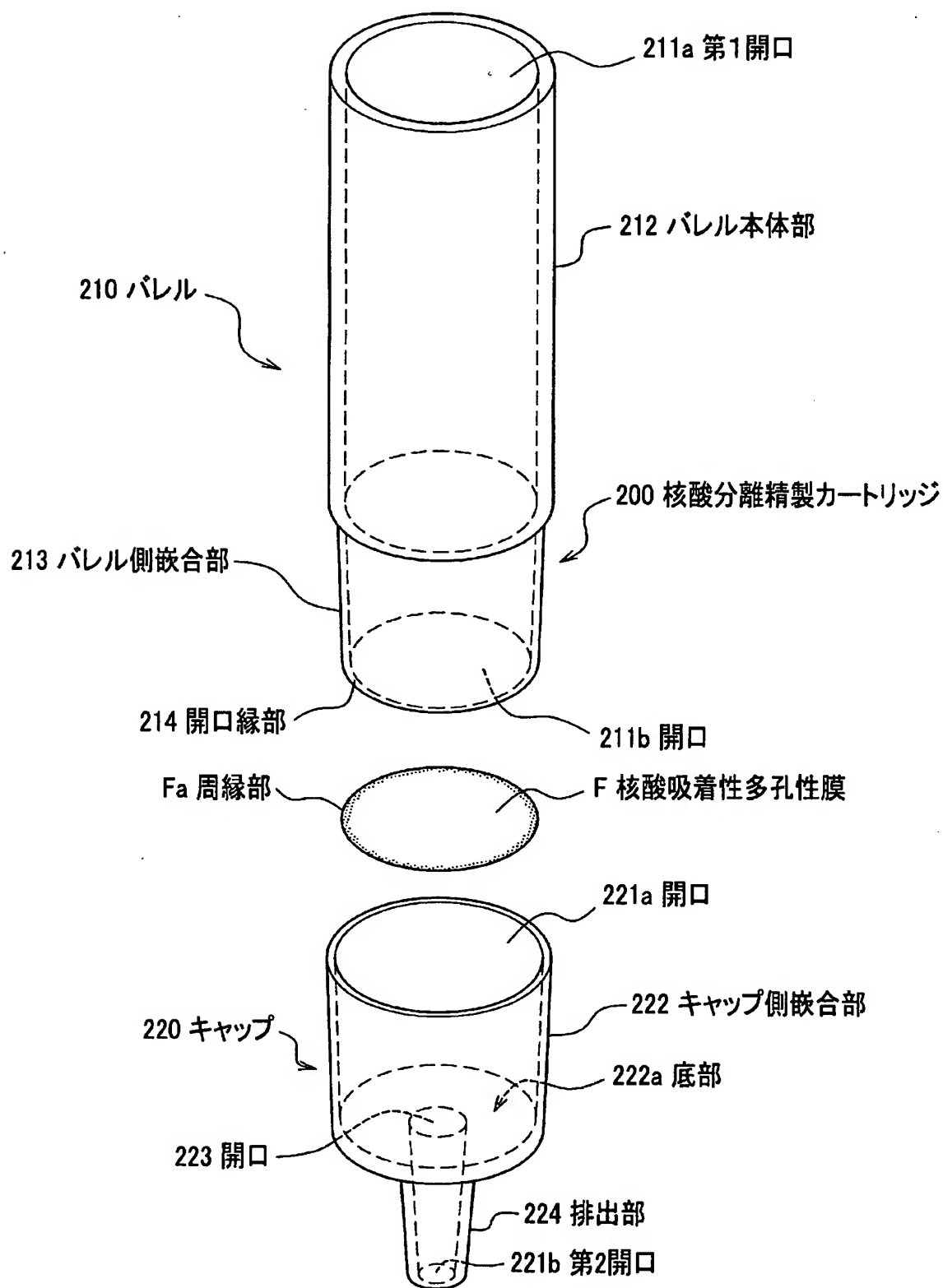
[図6]



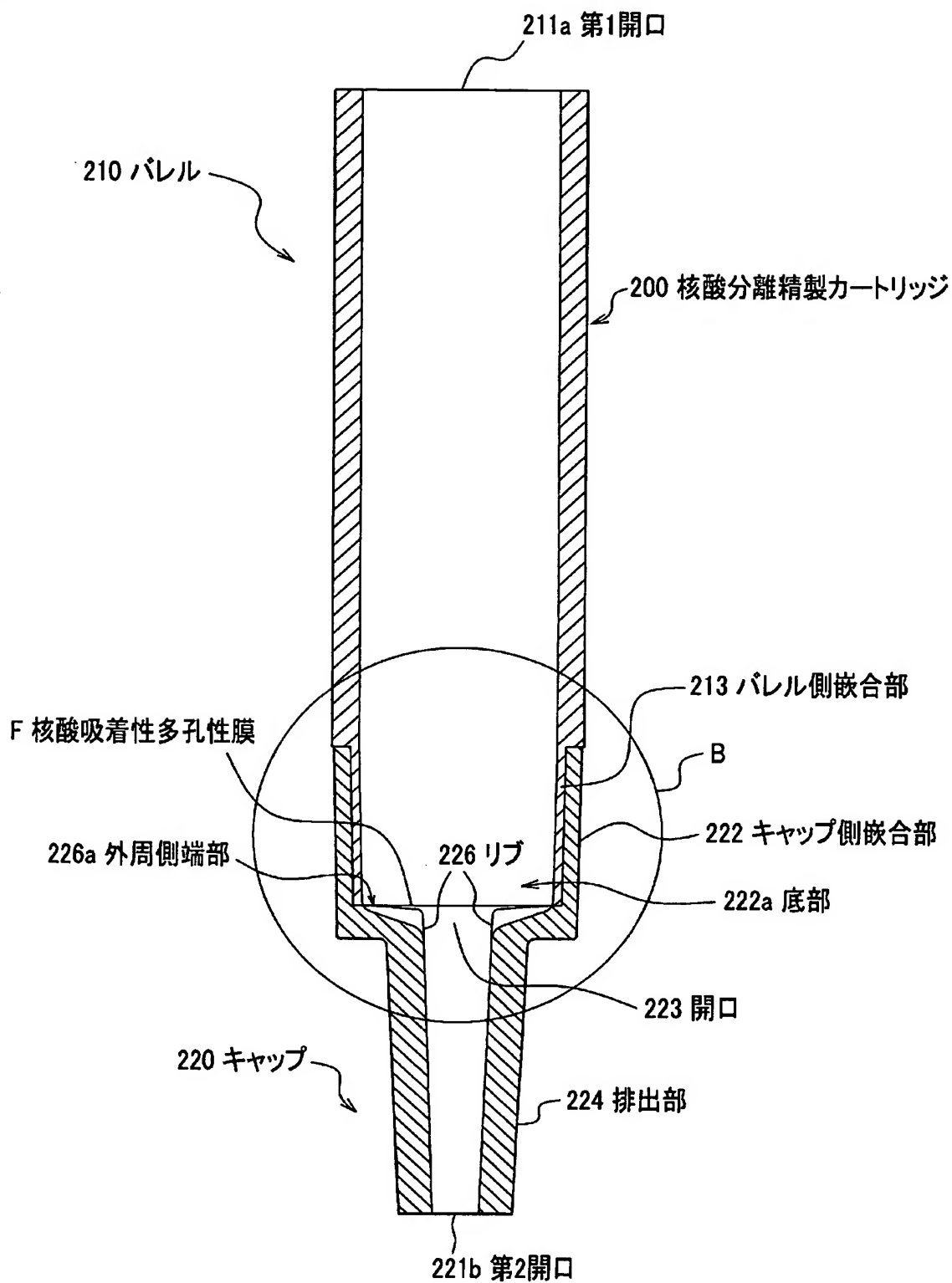
[図7]



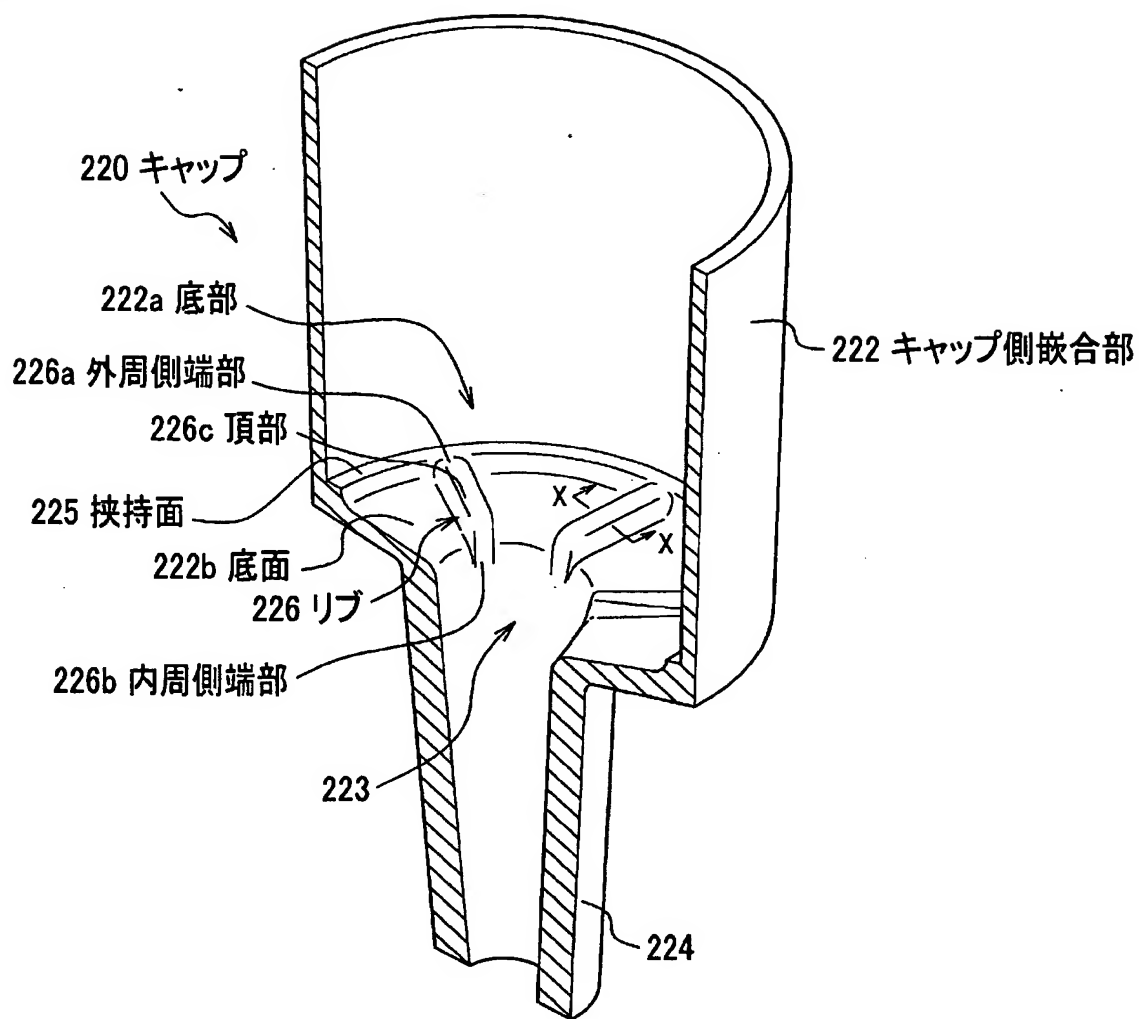
[図8]



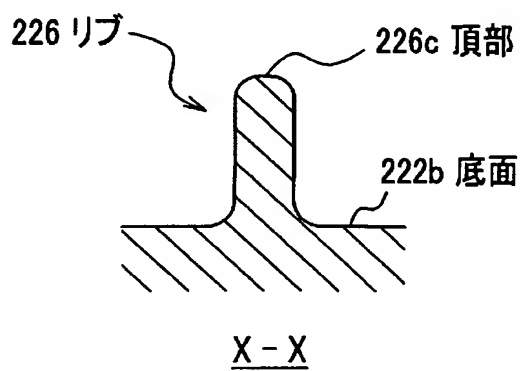
[図9]



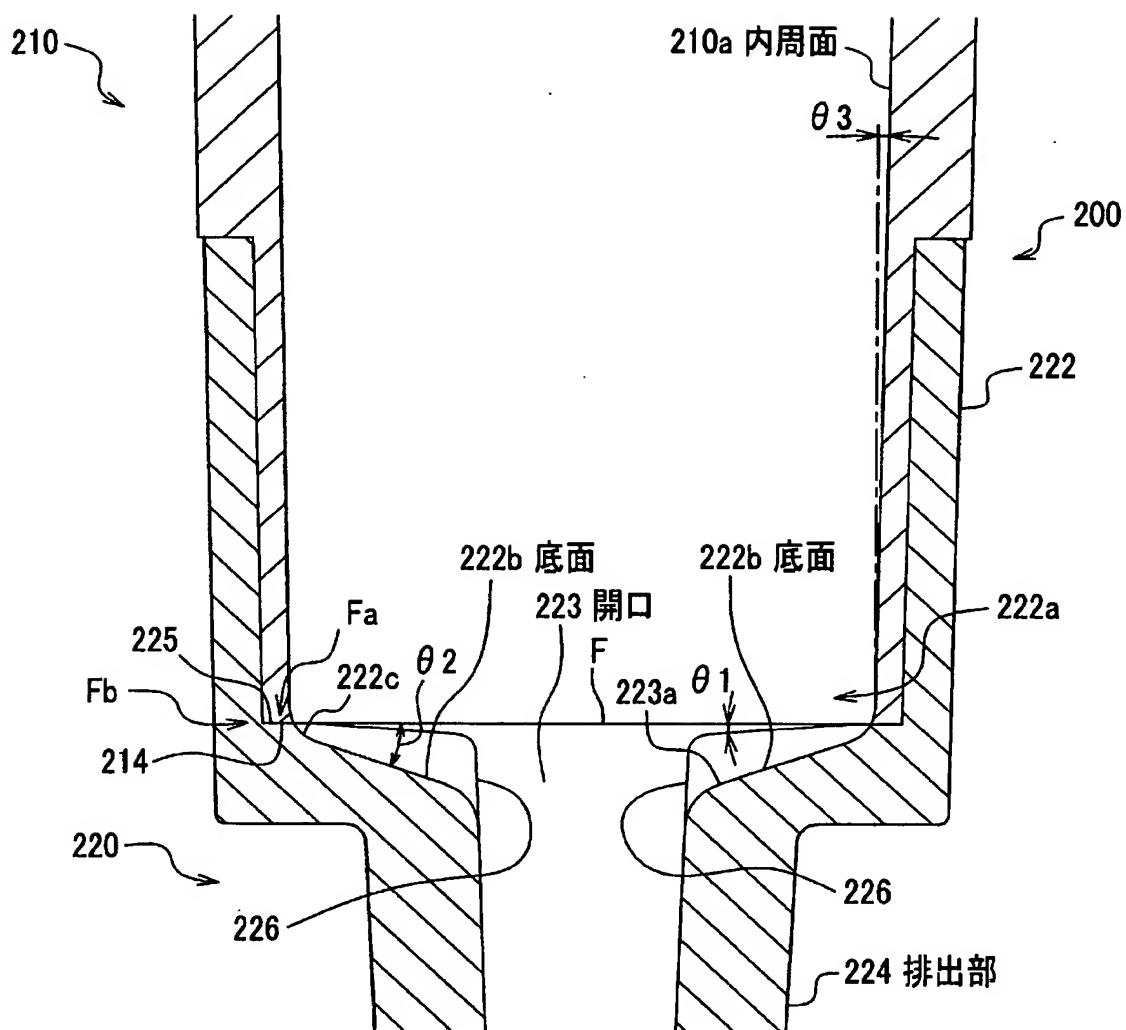
[図10]



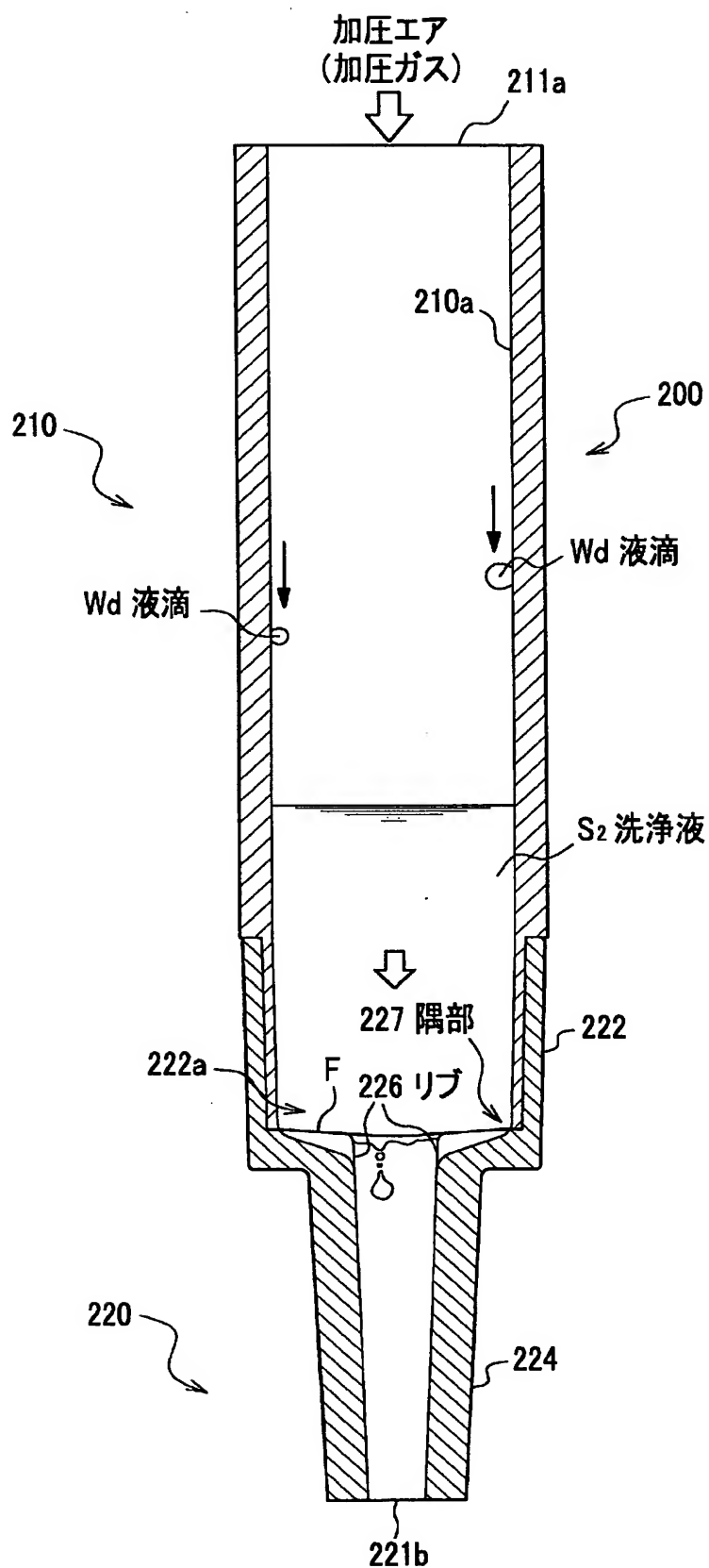
[図11]



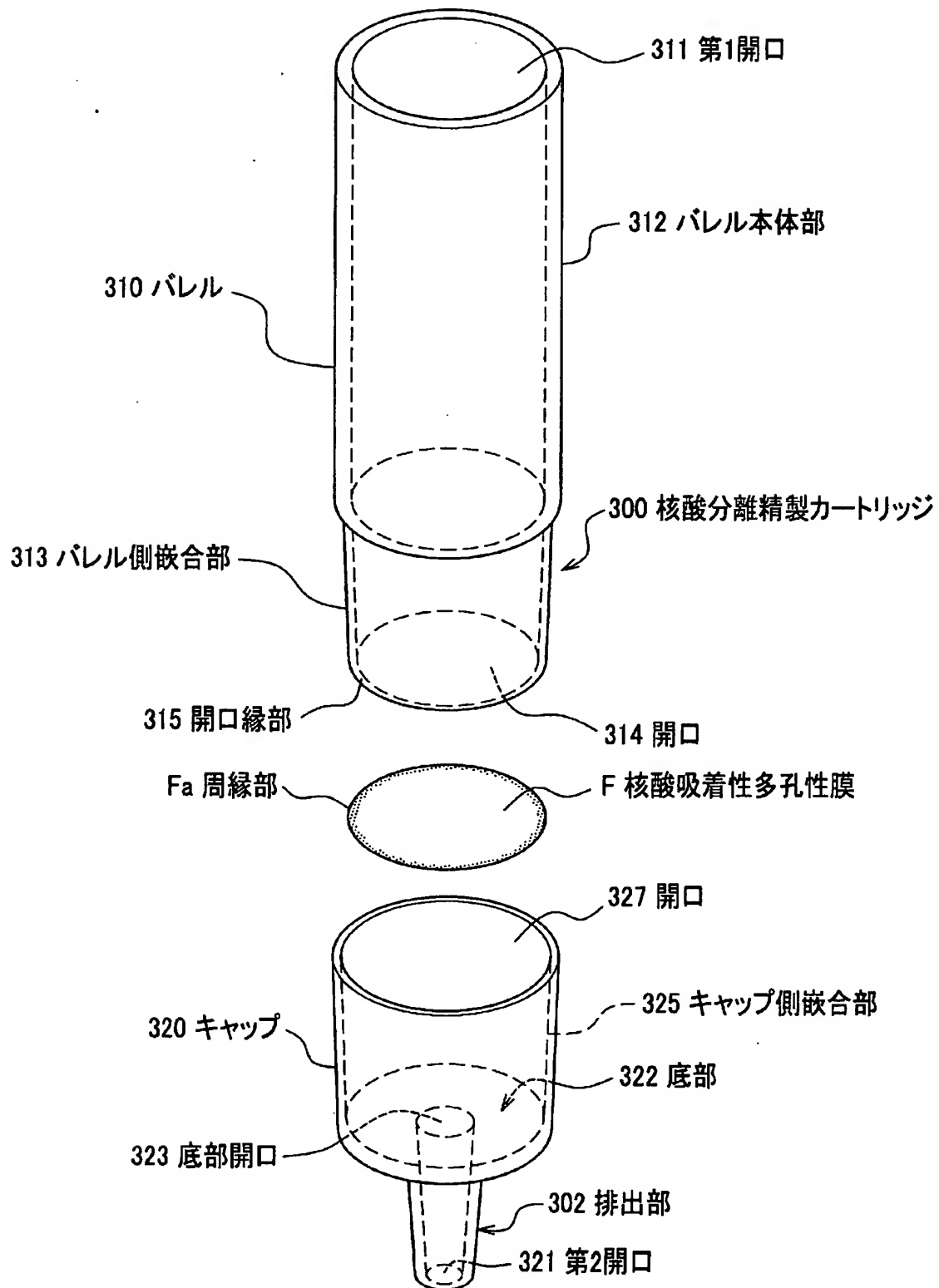
[図12]



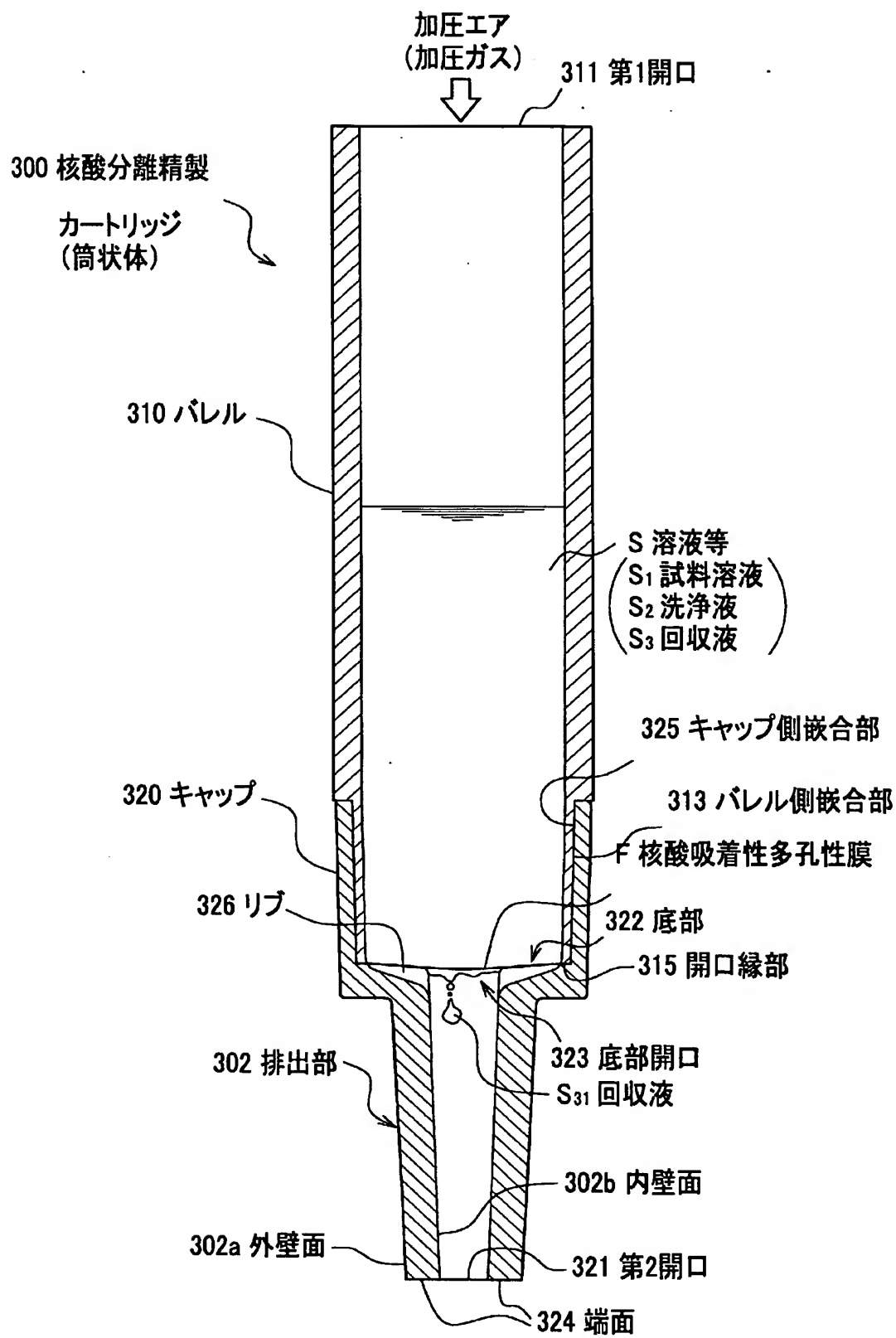
[図13]



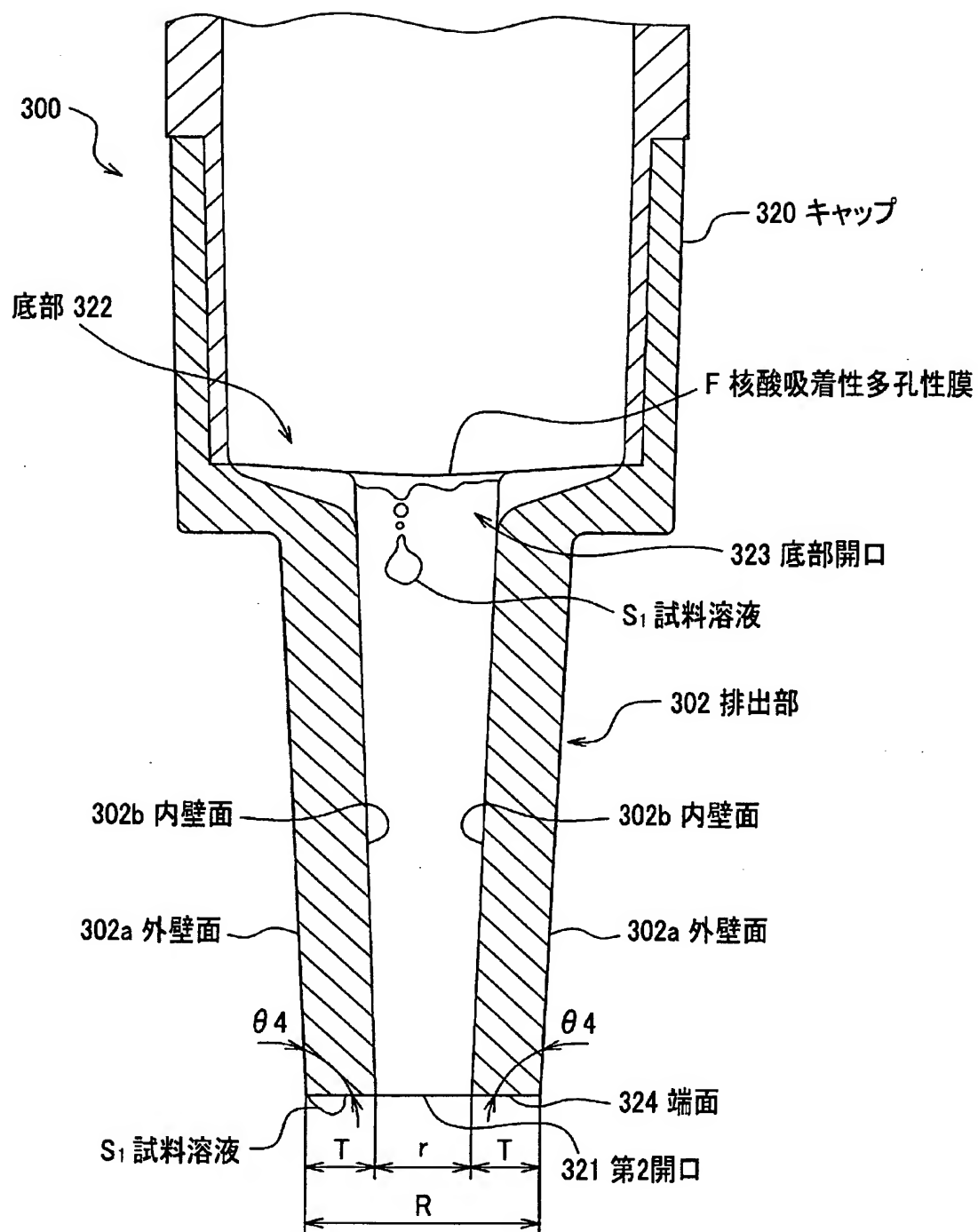
[図14]



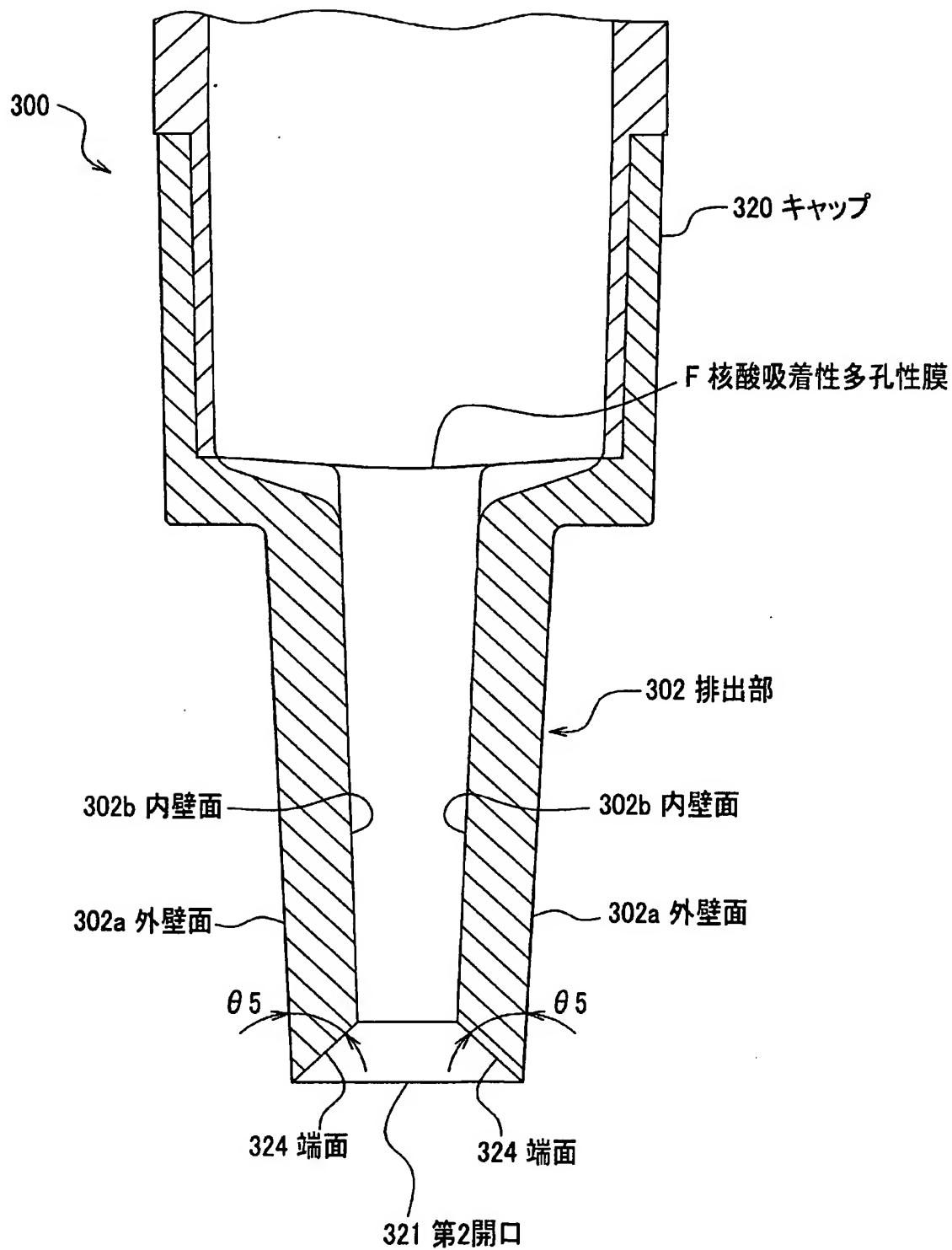
[図15]



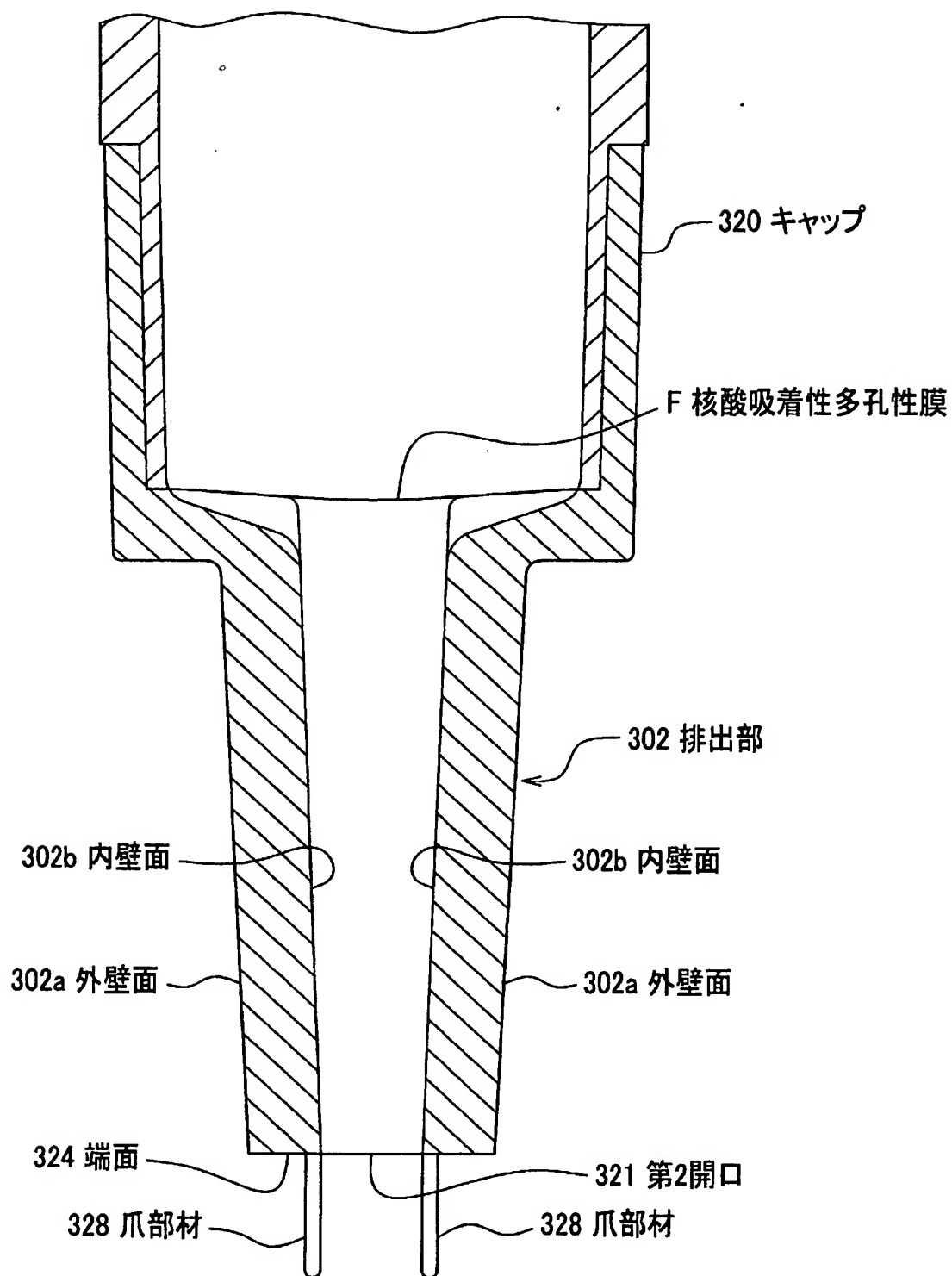
[図16]



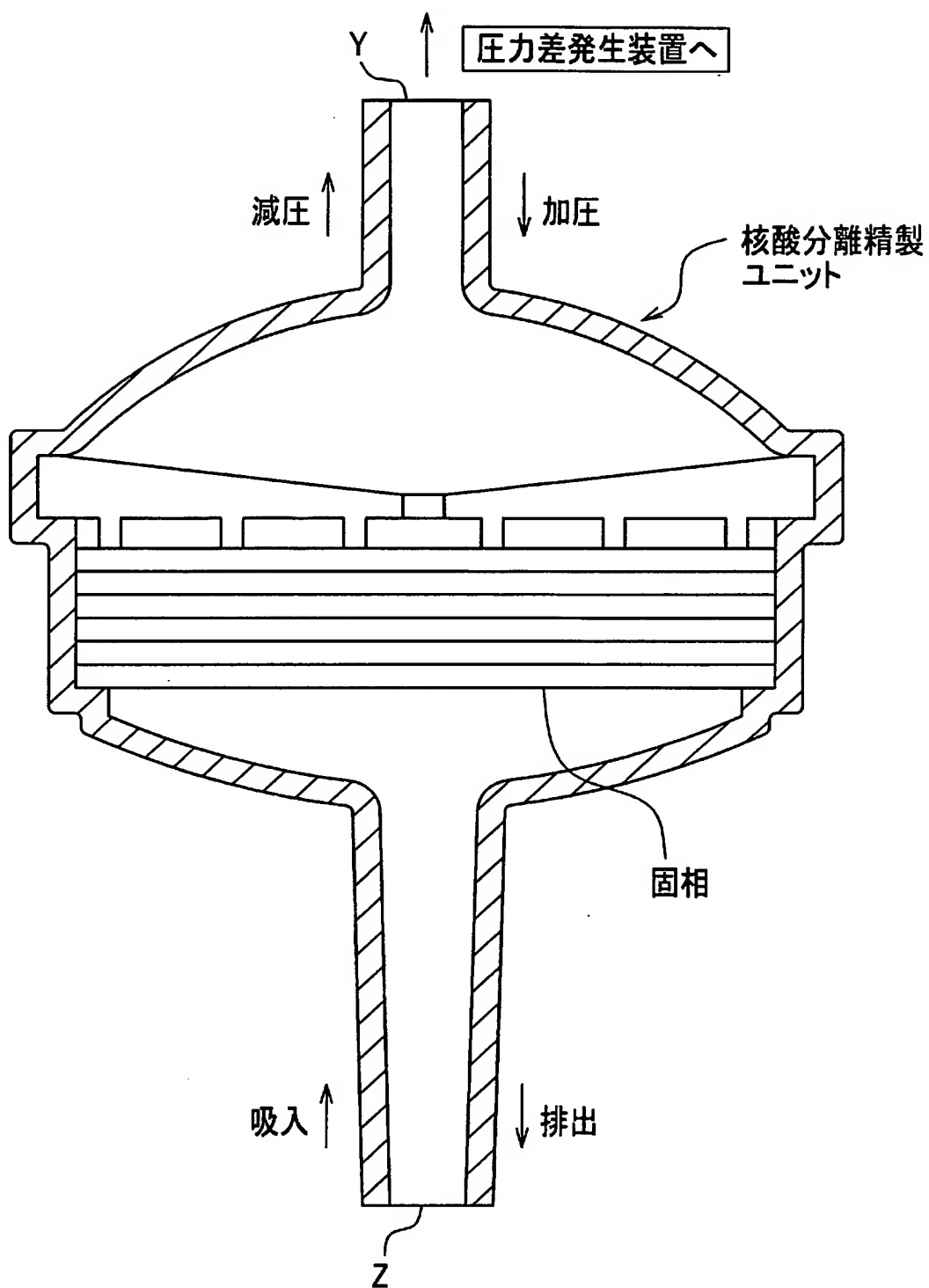
[図17]



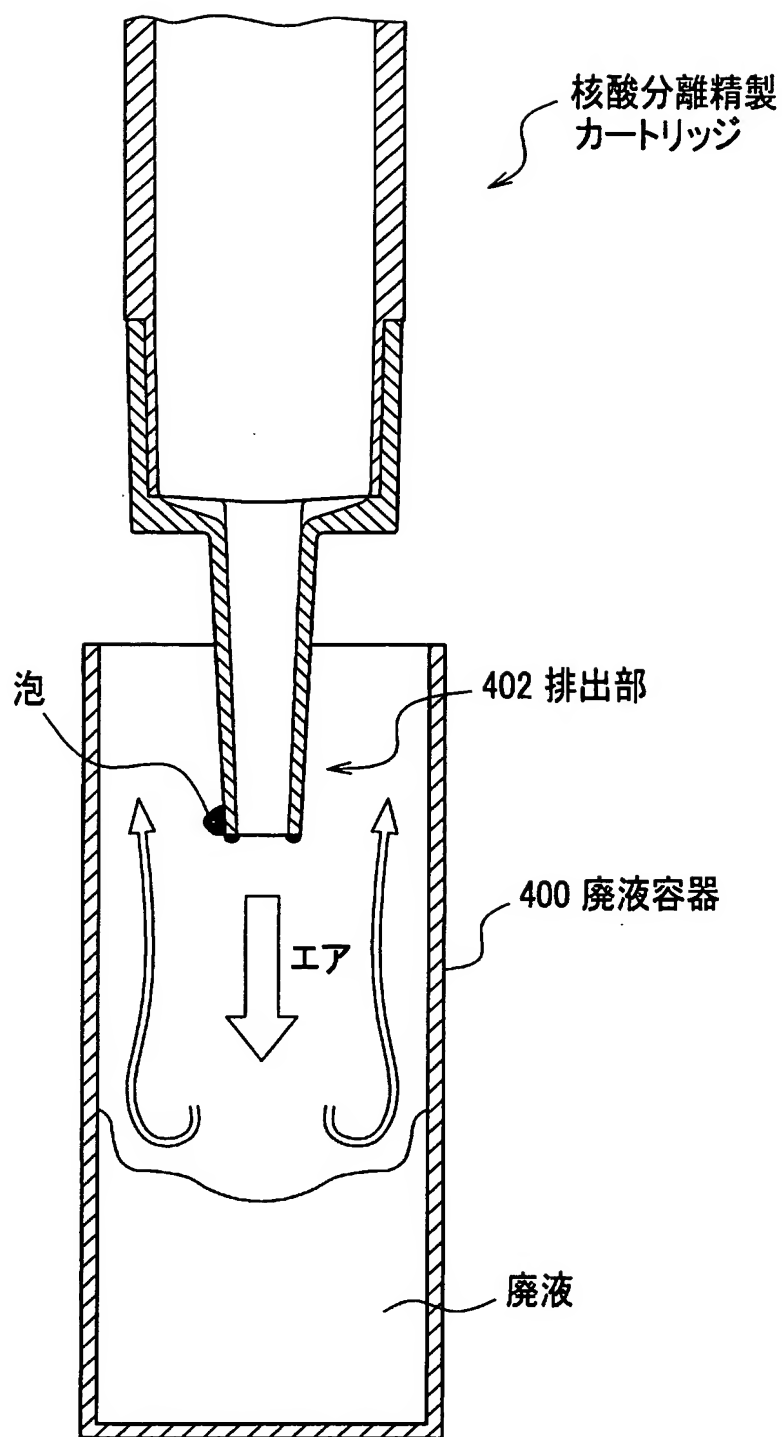
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12M1/00, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12M1/00, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2003-128691 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 08 May, 2003 (08.05.03), Full text & EP 1380642 A1 & US 2003/0170664 A1	<u>1-5, 12-20</u> 21-23
A	JP 3-230919 A (The Japan Steel Works, Ltd.), 14 October, 1991 (14.10.91), Full text (Family: none)	1-11
A	JP 2-75109 U (Fujirebio Inc.), 08 June, 1990 (08.06.90), Full text (Family: none)	12-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 November, 2004 (25.11.04)

Date of mailing of the international search report
14 December, 2004 (14.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013735

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-5 (invention group A) and the inventions of claims 6-11 (invention group B) relate to a nucleic acid separation purification cartridge having a nucleic acid adsorbent porous membrane wherein the part constituting the tube portion of tubular main body is molded in integration with the member. The inventions of claims 12-17 (invention group C) relate to a nucleic acid separation purification cartridge having a nucleic acid adsorbent porous membrane wherein the nucleic acid adsorbent porous membrane is provided so as to displace toward the discharge part as the membrane comes close to the bottom aperture. The inventions of claims 18-23 (invention group (continued to extra sheet.))

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013735

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

D) relate to a nucleic acid separation purification cartridge having a nucleic acid adsorbent porous membrane wherein the thickness of the part constituting the second opening is 0.2 mm or greater.

In view of the description of JP 2003-128691 A, among the "invention groups A and B", "invention group C" and "invention group D", it does not appear that there is a technical relationship involving special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence. Therefore, this international application does not satisfy the requirement of unity of invention.

Incidentally, since the invention group A and the invention group B satisfy the requirement of unity of invention, it appears that the number of inventions claimed in this international application is 3.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. CL' C12M1/00, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. CL' C12M1/00, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 2003-128691 A (富士写真フイルム株式会社) 2003. 5. 8, 全文 & EP 1380642 A1 & US 2003/0170664 A1	1-5, 12-20 21-23
A	JP 3-230919 A (株式会社日本製鋼所) 1991. 10. 14, 全文 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2-75109 U (富士レビオ株式会社) 1990. 6. 8, 全文 (ファミリーなし)	12-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 11. 2004

国際調査報告の発送日

14.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-5に係る発明(発明群A)と請求の範囲6-11に係る発明(発明群B)は、核酸吸着性多孔性膜を有する核酸分離精製カートリッジであって、筒状本体の筒部を形成する部分が前記部材と一体化されて成形される核酸分離精製カートリッジに関するものである。請求の範囲12-17に係る発明(発明群C)は、核酸吸着性多孔性膜を有する核酸分離精製カートリッジであって、核酸吸着性多孔性膜が前記底部開口に近づくほど前記排出部の方へ変位するように形成されている核酸分離精製カートリッジに関するものである。請求の範囲18-23に係る発明(発明群D)は、核酸吸着性多孔性膜を有する核酸分離精製カートリッジであって、第2開口を形成する部分の肉厚が0.2mm以上である核酸分離精製カートリッジに関するものである。

JP 2003-128691 A の記載からみて、「発明群AとB」、「発明群C」、「発明群D」の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとは認められないので、本国際出願は発明の単一性の要件を満たしていない。

なお、発明群Aと発明群Bは発明の単一性の要件を満たしているため、本国際出願の発明の数は3であると認められる。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。